

Entwicklung einer membranchromatographischen Methode zur Isolierung von Anthocyanen aus Heidelbeeren und weiteren Früchten

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Andreas Juadjur

aus Hildesheim

1. Referent: Professor Dr. Peter Winterhalter
2. Referent: apl. Professor Dr. Ulrich Engelhardt
eingereicht am: 10.10.2012
mündliche Prüfung (Disputation) am: 30.11.2012

Druckjahr 2013

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

PUBLIKATIONEN:

Juadjur, A.; Winterhalter, P.: Development of a novel adsorptive membrane chromatographic method for the fractionation of polyphenols from bilberry. *J. Agric. Food Chem.* 60(10), 2427-2433 (2012).

Juadjur, A.; Winterhalter, P.: Anthocyane aus Heidelbeeren. Neue membranchromatografische Methode zur Isolierung von Anthocyanen. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 108, 236-244 (2012).

Winterhalter, P., Jerz, G., Juadjur, A., Knorr, D., Jäger, H.: Abschlusspublikation zum DFG/AiF-Cluster „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“. Teilprojekt 1: Prozessinduzierte Ausbeutesteigerung von wertgebenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffen aus Blaubeeren und Vergleich ihrer Stabilität in Multikapselsystemen gegenüber konventionellen Produkten (AiF 15610 N). *Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V.*, 11-18 (2011), ISBN 978-3-925032-49-3.

TAGUNGSBEITRÄGE

Vorträge:

Winterhalter, P., Kuhnert, S., Juadjur, A., Macke, S.: Strategies for the Fractionation & Analysis of Polyphenols from By-products of Food Processing, 6th International Conference on Polyphenols Applications (ISANH Polyphenols 2012), 2012, Paris, Frankreich. Abstract in: Final Abstract Book Paris Polyphenols 2012, 32.

Juadjur, A., Winterhalter, P.: Entwicklung einer neuartigen membranchromatographischen Methode zur Isolierung von Anthocyanen aus Heidelbeeren und anderen anthocyanhaltigen Früchten. Regionalverbandstagung Nord "FOOD SCIENCE MEETS INDUSTRY" am 19./20. März 2012 in Hannover.

Poster:

Juadjur, A., Jerz, G.; Winterhalter, P.: Characterization and isolation of polyphenols from wild bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.), Shizuoka University International Symposium 2011 "Initiatives for Crossing Boundaries within Science and Technology", 28.-29. November 2011, Shizuoka, Japan.

Juadjur, A., Jerz, G., Winterhalter, P.: Prozessinduzierte Ausbeutesteigerung von wertgebenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffen aus Blaubeeren und Vergleich ihrer Stabilität in Multikapselsystemen gegenüber konventionellen Produkten. Teilprojekt 1, Forschungsstelle 1, ILC TU Braunschweig. FEI-Abschlussveranstaltung zum DFG/AiF-Clusterprojekt „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“ 09.11.2011, Karlsruhe

Juadjur, A., Jerz, G., Winterhalter, P.: Isolierung eines Cumaroyl-Iridoids, eines Depsids sowie eines seltenen p-Cumarsäurederivats aus Wildheidelbeerextrakt mittels LSRCCC. 39. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Stuttgart-Hohenheim, 2010. Abstract in: Lebensmittelchemie 65(2), 30 (2011).

Juadjur, A., Mierse, A. K., Hillebrand, S., Winterhalter, P.: Isolierung von Anthocyanen aus Granatapfel mittels High Speed Countercurrent Chromatography. 39. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Stuttgart-Hohenheim, 2010. Abstract in: Lebensmittelchemie 65(2), 30 (2011).

Juadjur, A.; Winterhalter, P.: Charakterisierung und Isolierung von Polyphenolen aus Wildheidelbeeren, 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 14. - 16. September 2009, Berlin. Abstract in: Lebensmittelchemie 64(5), 124-125 (2010).

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei all denjenigen, die mich bei dieser Arbeit in jeglicher Hinsicht unterstützt haben, einschließlich der fleißigen Heidelbeersammler, die mit großem Aufwand die gekühlten Heidelbeerproben aus ganz Deutschland nach Braunschweig gebracht haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. P. Winterhalter für sein stetes Interesse, seine Unterstützung sowie für die Betreuung der vorliegenden Arbeit. Bedanken möchte ich mich insbesondere für das in mich gesetzte Vertrauen, die Überlassung des spannenden Themas sowie die großzügigen Möglichkeiten und Freiräume bei der Bearbeitung. Außerdem danke ich für die Möglichkeit, meine Forschungsergebnisse auf nationalen und internationalen Tagungen präsentieren zu dürfen.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie für das Mitwirken an der Prüfungskommission möchte ich Herrn Prof. Dr. U. H. Engelhardt danken. Herrn Prof. Dr. D. Selmar danke ich für das Mitwirken an der Prüfungskommission.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. H.-U. Endress und Frau Prof. H. Schuchmann für die Koordinierung und die kompetente Leitung des „Heidelbeer“ Clusterprojektes sowie beim Programm zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) und dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (via AiF) über den Forschungsbereich der Ernährungsindustrie e. V. (FEI) für die Förderung dieser Arbeit zugrunde liegenden Forschungsvorhabens (AiF 15610 N). Außerdem gilt mein Dank allen Arbeitsgruppenleiter/innen und den Mitgliedern des Projektbegleitenden Ausschusses sowie den Doktoranden der beteiligten Forschungsgruppen: Henry Jäger, Johannes Oidtman, Markus Schantz, Christopher Kropat, Sabine Leick, Michael Betz, Kerstin Frank und Sonja Berg. Vielen Dank für die vielen ergiebigen Diskussionen und die unvergessliche Zeit, die wir auf Tagungen, Projekt- und Doktorandentreffen von Wien bis Braunschweig hatten.

Vielen Dank auch Herrn Martin Wörner und Herrn Dr. Wolfgang Demmer von der Firma Sartorius in Göttingen für die hilfreichen Diskussionen und die freundliche Unterstützung. Außerdem möchte ich den Firmen Kaden, Symrise und Bayernwald sehr herzlich für die zur Verfügung gestellten Extrakte, Konzentrate und Trester danken.

Der Shizuoka University danke ich für die Einladung zum Shizuoka University International Symposium 2011, sowie für das Stipendium und die Möglichkeit, dort meine Forschungsergebnisse zu präsentieren. Außerdem danke ich allen Initiatoren, Organisatoren sowie den Mitgliedern unserer Reisegruppe, die diesen Japanaufenthalt für mich zu einem unvergesslichen Erlebnis werden ließen.

Sehr danken möchte ich auch Herrn Dr. Gerold Jerz und Frau Dr. Silke Hillebrand für ihr immer offenes Ohr, ihren Rat und ihre Unterstützung in NMR-Fragen.

Frau Dr. Tuba Esatbeyoglu, Frau Dr. Andrea Wilkens und Frau Monika Messerer danke ich sehr für ihre Unterstützungen und ihren Rat, besonders während meiner Anfangszeit.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Frau Carola Balcke für das Korrekturlesen dieser Arbeit und vieler weiterer Manuskripte sowie für die durchgeführten Literaturrecherchen. Meiner Laborkollegin Frau Marita Baum danke ich für das immer sehr angenehme Arbeitsklima. Dieser Dank gilt natürlich auch allen meinen Arbeitskolleginnen und -kollegen.

Besonderer Dank geht an Annika Burmeister, Kathrin Ronneburg, Stefanie Kuhnert, Marcela Castro-Benitez, Recep Gök und Sebastian Macke für eure Unterstützung während der Endphase meiner Doktorarbeit sowie allen die mit mir gefeiert und zum Gelingen des wunderschönen Disputationstages beigetragen haben.

Auch für die vielen unvergesslichen Stunden außerhalb der Arbeitszeit bei Arbeitskreisabenden, Feiern und Institutsausflügen möchte ich euch allen danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Diplomanden Ulf Kalb, Christiane Kirschner und Stephanie Ebbinghaus sowie bei Daniela Butschbach und Ann-Katrin Mierse für die praktische Unterstützung dieser Arbeit.

Ein ganz großer Dank geht an meine Eltern und an meine Familie, ihr seid stets für mich da und habt mich immer in jeder Hinsicht unterstützt. Dafür danke ich euch sehr.

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit

gewidmet

**Das dieser Arbeit zugrunde liegende Forschungsvorhaben (AiF 15610 N)
wurde im Programm zur Förderung der „Industriellen
Gemeinschaftsforschung (IGF)“ vom Bundesministerium für Wirtschaft und
Technologie (via AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V.
(FEI) gefördert.**

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	XI
Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	XII
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Grundlagen und Kenntnisstand	3
2.1 Die europäische Wildheidelbeere (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	3
2.2 Polyphenole	4
2.2.1 Phenolsäuren	5
2.2.2 Flavonoide	7
2.2.2.1 Flavonole	7
2.2.2.2 Anthocyane	8
2.2.3 Biosynthese von Anthocyanen und anderen Polyphenolen	13
2.2.4 Antioxidative Aktivität	16
2.3 Grundlagen angewandeter Methoden	19
2.3.1 Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes (Folin-Ciocalteu)	19
2.3.2 Bestimmung der antioxidativen Aktivität („TEAC-Assay“)	19
2.3.3 Gegenstromverteilungschromatographie	20
2.3.3.1 High-Speed Countercurrent Chromatographie (HSCCC)	21
2.3.3.2 Low-speed rotary countercurrent chromatography (LSRCCC)	23
2.3.4 Membranchromatographie zur Isolierung von Anthocyanen	25
3 Ergebnisse und Diskussion	29
3.1 Charakterisierung von Heidelbeerproben und Produkten	29
3.1.1 Optimierung einer HPLC-Methode für Heidelbeeranthocyane	29
3.1.2 Charakterisierung frischer Heidelbeerproben	34
3.1.3 Prozessanalytik und Untersuchung der Anthocyanstabilität in Heidelbeerprodukten	42
3.1.4 Charakterisierung und Vergleich von Heidelbeerextrakten	44
3.2 Fraktionierung des Heidelbeerextraktes	46
3.2.1 Fraktionierung durch Lösungsmittelextraktionen und Fällungen	46
3.2.2 Fraktionierung des Heidelbeerextraktes mittels HSCCC	48
3.2.2.1 Untersuchung der antioxidativen Aktivität der Extraktfraktionen	50
3.3 Isolierung einer Polymerfraktion mittels LSRCCC	51

3.4	Fraktionierung der Copigmentfraktion sowie Isolierung und Strukturaufklärung unbekannter Verbindungen	54
3.4.1	HSCCC-Trennung der Copigmentfraktion.....	54
3.4.2	Trennung von Heidelbeercopigmenten mittels LSRCCC	58
3.4.3	Isolierung und Strukturaufklärung neuer Verbindungen aus der Copigmentfraktion...	62
3.5	Entwicklung einer membranchromatographischen Methode zur Isolierung von Anthocyanen	73
3.5.1	Methodenentwicklung im semipräparativen Maßstab	73
3.5.2	Scale-up der entwickelten membranchromatographischen Methode.....	85
3.5.3	Anwendung der Membranchromatographie zur Fraktionierung eines Heidelbeerextraktes.....	93
3.5.3.1	Trennung von Copigmenten und polymeren Extraktbestandteilen	95
3.5.3.2	Bestimmung der antioxidativen Aktivität der Subfraktionen	98
3.5.4	Anwendungsbeispiele zur Membranchromatographie	100
3.5.4.1	Fraktionierung phenolischer Verbindungen aus frischen Früchten.....	100
3.5.4.2	Membranchromatographie eines Heidelbeersaftes.....	101
3.5.4.3	Fraktionierung phenolischer Verbindungen aus Hibiskus.....	102
3.5.4.4	Isolierung von Cyanidin-3-glucosid aus Brombeeren.....	108
3.5.4.5	Isolierung von Anthocyan-Diglucosiden aus Granatapfel	110
3.6	Strategien zur Isolierung wertgebender Inhaltsstoffe aus Heidelbeertrester	116
3.6.1	Fraktionierung und Charakterisierung der lipophilen Inhaltsstoffe.....	116
3.6.2	Fraktionierung des Dichlormethanextraktes	123
3.6.2.1	Membranchromatographische Fraktionierung des methanolischen Rückstandes	124
4	Zusammenfassung	126
5	Material und Methoden	128
5.1	Probenmaterial	128
5.1.1	Rohstoffe	128
5.1.2	Extrakte	128
5.2	Chemikalien und Lösungsmittel	128
5.3	Geräte und Parameter	129
5.3.1	Zerkleinerungsgeräte	129
5.3.2	Photometer	129
5.3.3	pH-Meter	129
5.3.4	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie HPLC	130
5.3.4.1	Anlage.....	130

5.3.4.2	Säulen, Fließmittelsysteme und Gradienten	130
5.3.5	Präparative HPLC	131
5.3.6	HPLC-ESI-MS	132
5.3.7	NMR.....	132
5.3.8	Countercurrent Chromatography (CCC).....	133
5.3.8.1	High-speed countercurrent chromatography (HSCCC)	133
5.3.8.2	Low-speed rotary countercurrent chromatography (LSRCCC).....	133
5.3.9	Membranchromatographie.....	133
5.3.9.1	Vorfiltration	133
5.3.9.2	Membranadsorber	134
5.3.9.3	Probenaufgabe/Pumpsystem Membranchromatographie.....	135
5.4	Präparative Methoden	135
5.4.1	Trennungen mittels HSCCC	135
5.4.2	Trennungen mittels LSRCCC	137
5.4.3	Membranchromatographie.....	138
5.4.3.1	Durchführung der Membranchromatographie (semipräparativer Maßstab).....	138
5.4.3.2	Durchführung der Membranchromatographie (präparativer Maßstab)	139
5.4.4	Gewinnung von Rohextrakten aus frischen Früchten.....	141
5.4.5	Anreicherung von Polyphenolen mittels Amberlite® XAD-7	141
5.4.6	Entsalzen der Anthocyanfraktionen.....	141
5.4.7	Lösungsmittlextraktion der Copigmente.....	142
5.4.8	Hexanfällung der polymeren Extraktbestandteile	142
5.5	Analytische und quantitative Methoden	143
5.5.1	Bestimmungen mittels HPLC-DAD	143
5.5.2	Retentionsstudien Membranchromatographie	144
5.5.3	Dünnschichtchromatographie (DC).....	144
5.5.3.1	Dünnschichtchromatographie zur Analytik von Anthocyanen	144
5.5.3.2	Dünnschichtchromatographie zur Analytik lipophiler Verbindungen aus Heidelbeertrester	145
5.5.4	Photometrische Methoden	145
5.5.4.1	Bestimmung des Anthocyangehaltes mittels pH-Differentialmethode	145
5.5.4.2	Bestimmung des molaren Absorptionskoeffizienten.....	146
5.5.4.3	Bestimmung der antioxidativen Aktivität (TEAC-Assay)	147
5.5.4.4	Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu	148

5.5.5	Sonstige Methoden	149
5.5.5.1	Gravimetrische Bestimmung des Trockensubstanzgehaltes	149
5.5.5.2	Bestimmung von Schwellenwert und Farbbeitrag nach dem Farbaktivitätskonzept nach Hofmann (1998).....	149
5.6	Physikalisch-chemische Charakterisierung neuer erstmals aus <i>Vaccinium myrtillus</i> isolierter Verbindungen	151
5.7	Physikalisch-chemische Charakterisierung isolierter Anthocyane.....	153
6	Literatur.....	156
7	Anhang	168
7.1	El-MS-Spektren der aus Heidelbeertrester isolierten lipophilen Verbindungen.	168
7.1.1	Oleanolsäure (V1).....	168
7.1.2	α -Linolensäureethylester (V2).....	168
7.1.3	β -Tocopherol (V3)	169
7.1.4	Phytol (V4).....	169
7.1.5	β -Sitosterol (V5)	170
7.1.6	β -Amyrin (V6)	170

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1:	Wildheidelbeere (<i>Vaccinium myrtillus</i>) im Bayerischen Wald bei Grafenau (A. Juadjur).	3
Abb. 2.2:	Klassifizierung und Grundgerüst der Polyphenole, modifiziert nach Manach et al. (2004), Crozier et al. (2009), Iriti und Faoro (2009).	4
Abb. 2.3:	Chemische Struktur der wichtigsten Hydroxybenzoe- und Hydroxyzimtsäuren.	6
Abb. 2.4:	Chemische Struktur von Chlorogensäure (5-Caffeoyl(-)-Chinasäure; links) und 2-O-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxyphenylmethylacetat (rechts), ein aus Cranberry isoliertes Depsid (Turner et al., 2007).	6
Abb. 2.5:	Chemische Struktur der wichtigsten Flavonole.	7
Abb. 2.6:	Die Kornblume (<i>Centaurea cyanus</i>) erhält ihre leuchtend blaue Farbe durch Protocyanin (siehe Seite 12), ein Metallkomplex aus sechs Anthocyan- und sechs Flavonmolekülen (A. Juadjur).	8
Abb. 2.7:	Chemische Strukturen der wichtigsten natürlich vorkommenden Anthocyanidine.	9
Abb. 2.8:	Struktur- und Farbänderung der Anthocyane in Abhängigkeit vom pH-Wert in Anlehnung an Mazza und Miniati (1993), Lapidot et al. (1999).	10
Abb. 2.9:	Degradation der Anthocyanidine in Anlehnung an Fleschhut et al. (2006), Sadilova et al. (2007).	11
Abb. 2.10:	1970 von Hayashi et al. postulierter Anthocyan-, Flavon-, Magnesiumkomplex für Commelinin, den leuchtend blauen Pflanzenfarbstoff der gemeinen Tagblume (Goto und Kondo, 1991).	12
Abb. 2.11:	Biosynthese der Polyphenole in Anlehnung an Macheix et al. (1990), Tanner et al. (2003), Crozier et al. (2009).	14
Abb. 2.12:	Rolle der Oxidation des Low Density Lipoproteins (LDL) im frühen Stadium der Atherogenese in Anlehnung an Berliner und Heinecke (1996).	17
Abb. 2.13:	Einfluss von Polyphenolen mit Metallbindungsdomänen auf die Fenton-Reaktion (Perron und Brumaghim, 2009).	17
Abb. 2.14:	Struktur von Quercetin sowie die wichtigsten für die antioxidative Aktivität verantwortlichen funktionellen Gruppen.	18
Abb. 2.15:	Prinzip der Archimedisches Schraube nach Sutherland (1987).	21
Abb. 2.16:	Aufbau einer HSCCC-Anlage nach Sutherland (1987).	22
Abb. 2.17:	Prinzip der Phasenmischung und Phasentrennung der HSCCC (Ito und Conway, 1986).	22
Abb. 2.18:	Querschnitt eines LSRCCC-Prototypen mit horizontal angeordnetem in mehreren Schichten helical gewickelten Coil (Du und Ito, 2003) (links) aus „convoluted tubing“, einem Teflonschlauch mit helical eingearbeiteter Wandungsform (rechts).	24
Abb. 2.19:	Heterogenes Kraftfeld der LSRCCC (Köhler, 2006).	24
Abb. 2.20:	Chemische Struktur von Hydrosart®, einer säure- und laugenstabilen Cellulose. Rechts die Struktur der daraus hergestellten netzartigen Membran mit einem Porendurchmesser von 0,45 bis 3 µm im Vergleich mit Partikeln herkömmlicher chromatographischer Gel-Matrices (Bildquelle: Sartorius AG, Göttingen, Deutschland).	26
Abb. 2.21:	Dynamische Bindungskapazität in Abhängigkeit von der Flussrate bei Membran- und Gelchromatographie von Proteinen (Bildquelle: Sartorius AG, Göttingen, Deutschland).	26

Abb. 2.22: Mikroporöse netzartige Struktur der Sartobind Membran Adsorber bei Porengrößen von 0,45 bis 3 µm (links) und konvektiver Fluss durch den Membranadsorber, wobei die Zielmoleküle an der modifizierten Oberfläche adsorbiert werden (rechts) (Bildquelle: Sartorius AG, Göttingen, Deutschland).	27
Abb. 3.1: Vergleich der UV/Vis-Spektren von Delphinidin-3-glucosid (links) und Cyanidin-3-glucosid (rechts).	30
Abb. 3.2: HPLC-DAD-Chromatogramm des Heidelbeerextraktes (unten) sowie das zugehörige Chromatogramm bei 520 nm.	30
Abb. 3.3: Strukturen der Aglykone (Anthocyanidine) im Heidelbeerextrakt.	31
Abb. 3.4: Anthocyanprofil des kommerziellen Heidelbeerextraktes.	32
Abb. 3.5: Prozentuale Gehalte der Anthocyanglykoside im Heidelbeerextrakt.	32
Abb. 3.6: Anthocyangehalte im Heidelbeerextrakt während der zweijährigen Lagerung.	33
Abb. 3.7: Vergleich der HPLC-Chromatogramme frischer Wild- (oben) und Kulturheidelbeeren.	34
Abb. 3.8: Anthocyanprofil von Wildheidelbeeren, Kulturheidelbeeren und Heidelbeerextrakt.	35
Abb. 3.9: Verteilung der Glykoside in Wildheidelbeeren, Kulturheidelbeeren und im Extrakt.	35
Abb. 3.10: Verteilung der Aglykone im Gesamtanthocyangehalt frischer norddeutscher, süd-deutscher und polnischer Heidelbeeren, sowie im Heidelbeerextrakt.	36
Abb. 3.11: Verteilung der Aglykone in Heidelbeerproben aus dem Harz und dem restlichen Niedersachsen im Zweijahresvergleich.	36
Abb. 3.12: Verteilung der Aglykone im Gesamtanthocyangehalt von Proben gleicher Herkunft in zwei aufeinanderfolgenden Jahren im Vergleich.	37
Abb. 3.13: Gesamtanthocyangehalte der Wildheidelbeerproben aus dem Jahr 2008.	39
Abb. 3.14: Vergleich der durchschnittlichen Gesamtanthocyangehalte von Wildheidelbeerproben aus den Jahren 2008 und 2009.	40
Abb. 3.15: Korrelation zwischen antioxidativer Aktivität und Gesamtpolyphenolgehalt frischer Heidelbeerproben.	41
Abb. 3.16: Korrelation zwischen antioxidativer Aktivität und Gesamtanthocyangehalt frischer Heidelbeerproben.	41
Abb. 3.17: Korrelation zwischen Anthocyangehalt und Gesamtpolyphenolgehalt frischer Heidelbeerproben.	42
Abb. 3.18: Veränderung des Anthocyangehaltes während der einzelnen Prozessschritte der Heidelbeermarmeladen-Herstellung.	42
Abb. 3.19: Temperatur-Zeit-Profil der Heidelbeersaftherstellung (links) und Veränderung des Anthocyangehaltes während der einzelnen Prozessschritte (rechts) nach Jäger und Knorr in FEI ...	43
Abb. 3.20: Gesamtanthocyangehalt in den Presssäften aus unterschiedlich vorbehandelten Maischen (ohne Vorbehandlung ,no‘ mit und ohne Standzeit; Gefrier-Tau-Prozess ,FT‘ bei -10°C für 2 x 2 h; Hochspannungsimpulse ,PEF‘ bei 4 kV/cm und 30 kJ/kg; Enzymierung ,ENZ‘, Enzymierungstemperatur 45 °C) nach Jäger und Knorr in FEI	44
Abb. 3.21: Vergleich der Anthocyanprofile von XAD-7 Extrakt aus Saftkonzentrat und dem Projektextrakt.	45
Abb. 3.22: Fließschema zur Fraktionierung des Heidelbeerextraktes durch Lösungsmittel-Extraktionen und Fällungen.	46

Abb. 3.23: HPLC-DAD-Chromatogramme der nach Lösungsmittel-Extraktion und Fällungen erhaltenen Copigment- und Anthocyanfraktion.....	46
Abb. 3.24: HSCCC-Chromatogramm der Trennung von 525 mg Heidelbeerextrakt mit dem Fließmittelsystem TBME/n-BuOH/MeCN/H ₂ O im Verhältnis 1:3:1:5 (v/v/v/v) + 0,1% TFA.	48
Abb. 3.25: Vergleich des HPLC-DAD-Chromatogrammes des Heidelbeerextraktes mit einigen aus seiner Trennung erhaltenen ausgewählten HSCCC-Fraktionen.	49
Abb. 3.26: Antioxidative Aktivität und Gesamtpolyphenolgehalt der HSCCC-Fraktionen. I und II (Polymerfraktionen), III, IV, V, VI, VII, VIII (Anthocyanfraktionen) und Coifraktion (Copigmente). ..	50
Abb. 3.27: LSRCCC-Chromatogramm der Trennung von 25 g Heidelbeerextrakt und Übersicht über die Auswaagen der erhaltenen gefriergetrockneten Fraktionen (F).....	51
Abb. 3.28: HPLC-DAD-Chromatogramme ausgesuchter LSRCCC- und HSCCC-Fraktionen aus Heidelbeerextrakt sowie das Chromatogramm der HSCCC-Trennung zur Isolierung einer Polymerfraktion aus der LSRCCC-Fraktion 1.	52
Abb. 3.29: Anordnung von Partikeln unterschiedlicher Größe während der Fokussierung (oben) und der anschließenden Trennung (unten) durch die asymmetrische Fluss-Feldfluss-Fraktionierung.....	53
Abb. 3.30: HSCCC-Chromatogramm der Trennung von 625 mg der Copigmentfraktion aus Heidelbeerextrakt. Fließmittelsystem: Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser im Verhältnis 1:5:1:5 (v/v/v/v).	54
Abb. 3.31: Antioxidative Aktivitäten und Gesamtpolyphenolgehalte der HSCCC-Fraktionen aus der Trennung der Heidelbeer-Copigmente.	55
Abb. 3.32: HPLC-Chromatogramm der Copigmentfraktion des Heidelbeerextraktes. Nummerierung der Verbindungen nach Tab. 3.6.	57
Abb. 3.33: Extraktionsschema zur Gewinnung einer Copigmentfraktion aus dem Heidelbeerextrakt zur Trennung mittels LSRCCC.	58
Abb. 3.34: Mittels HPLC-DAD Messungen erhaltenes Chromatogramm der Trennung von 11,3 g der Copigmentfraktion aus Heidelbeerextrakt.....	59
Abb. 3.35: HPLC-DAD-Chromatogramme einiger ausgewählter LSRCCC-Fraktionen der Trennung der Copigmentfraktion des kommerziellen Heidelbeerextraktes (Nummerierung siehe Tab. 3.8).	59
Abb. 3.36: MS ² -Massenspektrum von 10- <i>p-trans</i> -Cumaroyl-1S-Monotropein, ein Cumaroyl-Iridoid aus der Copigmentfraktion des Heidelbeerextraktes.	61
Abb. 3.37: HPLC-DAD-Chromatogramm der LSRCCC-Fraktion 1	62
Abb. 3.38: HSCCC-Chromatogramm der Trennung von 670 mg der LSRCCC-Fraktion 1.	62
Abb. 3.39: MS ² -Fragmentierung (oben) und vorgeschlagener Fragmentierungsmechanismus (rechts) des Depsids mit dem Pseudo-molekülion [M-H] ⁺ <i>m/z</i> 335.	63
Abb. 3.40: HSCCC-Chromatogramm der Trennung von 950 mg der LSRCCC-Fraktionen 7-9.....	64
Abb. 3.41: ¹ H-NMR Spektrum von 2-O-(3,4,5-Trihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxyphenyllessigsäure ein aus Heidelbeer isoliertes Depsid, sowie zur Strukturaufklärung wichtige ^{2,3} J- ¹ C- ¹³ H-Fernkorrelationen des HMBC-Spektrums.....	65
Abb. 3.42: ¹³ C-NMR Spektrum von 2-O-(3,4,5-Trihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxyphenyllessigsäure, ein aus Heidelbeerextrakt isoliertes Depsid.....	66
Abb. 3.43: MS ² -Fragmentierung (links) und UV-Spektrum (rechts) des Cumarsäure-Derivates.	66
Abb. 3.44: ¹ H-NMR Spektrum von (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(β-D-Glucopyranosyloxy)-pentan-2-yl-(2 <i>E</i>)- <i>p</i> -cumarat.	67

Abb. 3.45: HMBC-Spektrum von (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(β -D-Glucopyranosyloxy)-pentan-2-yl-(2 <i>E</i>)- <i>p</i> -cumarat.	67
Abb. 3.46: MS ² -Spektrum des Cumaroyl-Iridoids (oben) sowie der nach Hokkanen et al. (2009) vorgeschlagene Fragmentierungsmechanismus dieser Verbindung (rechts).	68
Abb. 3.47: HSCCC-Chromatogramm der Trennung von 630 mg der LSRCCC-Coilfraktion I.	69
Abb. 3.48: Chemische Struktur von 10- <i>p-trans</i> -Cumaroyl-1 <i>S</i> -Monotropein.	70
Abb. 3.49: HSQC-Spektrum der Verbindung 10- <i>p-trans</i> -Cumaroyl-1 <i>S</i> -Monotropein.	71
Abb. 3.50: HMBC-Spektrum der Verbindung 10- <i>p-trans</i> -Cumaroyl-1 <i>S</i> -Monotropein.	71
Abb. 3.51: Chemische Struktur von Monotropein (R ₁ = OH, R ₂ = CH ₂ OH) und Gardenosid (R ₁ = CH ₂ OH, R ₂ = OH) nach Chaudhuri et al. (1980) und Choi et al. (2005).	72
Abb. 3.52: Anthocyanretention der Sartobind S75 Membranadsorber-Einheiten. Heidelbeerextrakt gelöst in wässriger HCl (pH 2).	74
Abb. 3.53: Chlorogensäure- und Quercetinretention der Sartobind S75 Membranadsorber-Einheiten. Heidelbeerextrakt gelöst in wässriger HCl (pH 2).	75
Abb. 3.54: Anthocyanretention der Sartobind S75 Membranadsorber-Einheiten. Heidelbeerextrakt gelöst in Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) und Ethanol/Eisessig, 19:1 (v/v).	76
Abb. 3.55: Chlorogensäure- und Quercetinretention der Sartobind S75 Membranadsorber-Einheiten. Heidelbeerextrakt gelöst in Methanol/Eisessig, 19:1 (v/v).	76
Abb. 3.56: Chlorogensäure- und Quercetinretention der Sartobind S75 Membranadsorber-Einheiten. Heidelbeerextrakt gelöst in Ethanol/Eisessig, 19:1 (v/v).	77
Abb. 3.57: Anthocyanretention der Sartobind S75 Membranadsorber-Einheiten. Heidelbeerextrakt gelöst in Methanol/Eisessig, 19:1 (v/v).	77
Abb. 3.58: Vergleich der Elutionskurven der Anthocyane mit 0,1 M NaCl- und 0,1 M Ammoniumacetatlösung, jeweils gemischt mit Methanol im Verhältnis 1:1 (v/v), von der Sartobind S75 Membranadsorber-Einheit.	79
Abb. 3.59: Fließschema zur Membranchromatographie im semipräparativen Maßstab.	80
Abb. 3.60: Vergleich der Polyphenolgehalte der Fraktionen des in wässriger HCl (pH 2) mit der Konzentration 1 mg/mL gelösten und mittels Membranchromatographie fraktionierten Heidelbeerextraktes.	81
Abb. 3.61: Vergleich der Polyphenolgehalte der Fraktionen des in Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) mit der Konzentration 1 mg/mL gelösten und mittels Membranchromatographie fraktionierten Heidelbeerextraktes.	81
Abb. 3.62: Vergleich der Polyphenolgehalte der Fraktionen des in Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v) mit der Konzentration 1 mg/mL gelösten und mittels Membranchromatographie fraktionierten Heidelbeerextraktes.	82
Abb. 3.63: Vergleich der HPLC-DAD-Chromatogramme des Extraktes und der nach Membranchromatographie mit Sartobind S75 erhaltenen Fraktionen.	82
Abb. 3.64: HPLC-DAD-Chromatogramme der erhaltenen Fraktionen nach Membranchromatographie eines Cranberrysaftes.	84
Abb. 3.65: Für das Scale-up verwendete Membranadsorbereinheit Sartobind S IEX 150 ml sowie ein Querschnitt zur Veranschaulichung des Strömungsprofils (Bildquelle: Sartorius, Göttingen, Deutschland).	85

Abb. 3.66: Fließschema für das Scale-up der Membranchromatographie zur Isolierung von Anthocyanen im präparativen Maßstab.	86
Abb. 3.67: Versuchsaufbau für die Durchführung der Membranchromatographie zur Isolierung von Anthocyanen.	86
Abb. 3.68: Vergleich der Anthocyanretention des Membranadsorbers bei unterschiedlichen Extraktkonzentrationen von 2 g/L und 10 g/L, gelöst in MeOH/Eisessig 19:1 (v/v), bezogen auf die aufgegebene Extraktmenge.	87
Abb. 3.69: Retentionsstudie zum Vergleich der dynamischen Bindungskapazitäten für Anthocyane bei variablen Flussraten. Heidelbeerextrakt gelöst in MeOH/Eisessig 19:1 (v/v), Konz. 10 g/L.....	88
Abb. 3.70: Vergleich der dynamischen Bindungskapazitäten für Anthocyane bei Variation von Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) bzw. Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v) als Extraktlösungsmittel mit der Extraktkonzentration 10 g/L.....	89
Abb. 3.71: Anthocyanretention während einer zweiten membranchromatographischen Trennung zur Befreiung der Permeat- und Spülfraction von Restanthocyanen.	89
Abb. 3.72: Anthocyanretention des Adsorbers bis zum Erreichen der max. Bindungskapazität	90
Abb. 3.73: Retention der Copigmente während der Probenbeladung des in MeOH/Eisessig 19:1 (v/v) gelösten Extraktes mit der Konzentration 2 g/L.....	91
Abb. 3.74: Gehalte an Copigmenten und Anthocyanen in der Spüllösung während des Spülschrittes mit Methanol/Eisessig 19:1 (v/v).....	92
Abb. 3.75: Elutionskurve der retardierten Anthocyane mit 1M methanolischer NaCl-Lsg. 50:50 (v/v).....	92
Abb. 3.76: HPLC-Chromatogramme des Extraktes (1) sowie der nach Membranchromatographie erhaltenen Anthocyan- (2) und Durchflussfraction (3). Links (a) detektiert bei jeweils [280 nm] und rechts (b) bei jeweils [520 nm]. Peak-Nr. siehe Tab. 3.1.	94
Abb. 3.77: Fraktionierungsschema der Permeatfraction sowie HPLC-DAD-Chromatogramme der erhaltenen Subfractionen.	96
Abb. 3.78: Fraktionierungsschema und prozentuale Massenanteile der Subfractionen des Heidelbeerextraktes.	97
Abb. 3.79: Antioxidative Aktivität und Gesamtpolyphenolgehalt der Subfractionen des Heidelbeerextraktes nach Fraktionierung mittels Membranchromatographie und Lösungsmittelfällungen.	99
Abb. 3.80: Anthocyanretention während der ersten (oben) und zweiten (unten) Membranchromatographie eines Heidelbeersaftes.	101
Abb. 3.81: Fließschema zur Anreicherung phenolischer Komponenten aus Hibiskus-Rohextrakt.....	103
Abb. 3.82: Base Peak Chromatogramme (negativer (a) und positiver (b) Modus) sowie HPLC-DAD-Chromatogramm (c) des Hibiskusextraktes. Zuordnung der Peaks nach Tab. 3.15.	104
Abb. 3.83: Überblick über die chemischen Strukturen der Verbindungen des Hibiskusextraktes. Nummerierung analog Tab. 3.15.....	105
Abb. 3.84: Retention der Anthocyane während der Membranchromatographie eines Hibiskusextraktes.	105
Abb. 3.85: Retention der Chlorogensäuren während der Membranchromatographie eines Hibiskusextraktes.	106
Abb. 3.86: Elutionskurve der Hibiskus-Anthocyane mit der NaCl-haltigen methanolischen Elutionslösung von der Membranadsorbereinheit.....	106

Abb. 3.87: HPLC-DAD-Chromatogramme der nach Membranchromatographie erhaltenen Subfraktionen des Hibiskusextraktes.	107
Abb. 3.88: HPLC-DAD-Chromatogramme des XAD-7 Extraktes aus frischen Brombeeren sowie aus der durch Membranchromatographie gewonnenen Anthocyanfraktion.	108
Abb. 3.89: Anthocyanretention während der ersten (oben) und zweiten (unten) membranchromatographischen Trennung einer Brombeerextraktlösung der Konzentration 12,5 g/L, gelöst in Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v).	109
Abb. 3.90: Chemische Struktur der im Granatapfel vorkommenden Anthocyane. Die gezeigten Aglykone kommen jeweils als 3-Glucoside ($R_3 = \text{Glucose}$; $R_5 = \text{H}$) sowie als 3,5-Diglucoside (R_3 und $R_5 = \text{Glucose}$) im Granatapfel vor.	110
Abb. 3.91: HPLC-Chromatogramm und HSCCC-Chromatogramm der Trennung des XAD-7-Extraktes aus Granatapfel. Peak Nummerierung siehe Text, m = Mischfraktion.	111
Abb. 3.92: HPLC-DAD-Chromatogramme des Granatapfelextraktes sowie der mittels Membranchromatographie aus dem Extrakt erhaltenen Subfraktionen.	113
Abb. 3.93: HSCCC-Chromatogramm der Trennung der aus der Membranchromatographie erhaltenen Anthocyanfraktion aus Granatapfel, m = Mischfraktion.	113
Abb. 3.94: HPLC-Chromatogramme des Granatapfelextraktes und ausgesuchter HSCCC-Fractionen aus der Trennung des Extraktes und der Trennung der mittels Membranchromatographie erhaltenen Anthocyanfraktion aus Granatapfelextrakt.	114
Abb. 3.95: Extraktionsschema zur Untersuchung und Isolierung von Inhaltsstoffen aus dem Heidelbeertrester.	116
Abb. 3.96: Base-Peak-Chromatogramme (BPC) der HPLC-APCI-MS-Messung des Hexanextraktes für unterschiedliche Molekulargewichtsbereiche.	117
Abb. 3.97: HSCCC-Chromatogramm der Trennung von 3 g des Hexanextraktes aus Heidelbeertrester mit dem Fließmittelsystem: Hexan/Acetonitril 1:1 (v/v).	118
Abb. 3.98: Analyse der HSCCC-Fractionen des Hexanextraktes mittels Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel. Laufmittel: Dichlormethan/Hexan 9:1 (v/v) links und Dichlormethan/Aceton 19:1 (v/v) rechts. Detektion mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz nach Stahl (1967).	119
Abb. 3.99: Dünnschichtchromatogramm der 35 erhaltenen HSCCC-Fractionen aus dem Hexanextrakt des Heidelbeertresters. Laufmittel: Dichlormethan/Hexan 9:1 (v/v) auf Kieselgel, Detektion mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz nach Stahl (1967). Zuordnung der nummerierten Spots anhand der Tab. 3.20.	120
Abb. 3.100: EI-MS-Fragmentierungsmechanismus der isolierten Oleanolsäure nach Ayatollahi et al. (2011).	121
Abb. 3.101: EI-MS-Spektrum von β -Amyrin und der nach Klaubert (1998) postulierte Fragmentierungsmechanismus.	122
Abb. 3.102: Fraktionierung der HSCCC-Trennung des Dichlormethanextraktes anhand der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel. Laufmittel: Dichlormethan/Aceton 19:1 (v/v), Detektion mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz nach Stahl (1967).	123

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1:	UV/Vis-Absorption und LC-ESI-MS ⁿ -Daten der Heidelbeeranthocyane	31
Tab. 3.2:	Überblick über die Trockenmassen, den Gesamtpolyphenolgehalt und die antioxidative Aktivität frischer Wildheidelbeerproben aus dem Jahre 2008.....	38
Tab. 3.3:	Polyphenolgehalte in den durch Lösungsmittel-Extraktion und Fällungen erhaltenen Subfraktionen des Heidelbeerextraktes.....	47
Tab. 3.4:	Überblick über die erhaltenen HSCCC-Fractionen der Trennung des Heidelbeerextraktes	49
Tab. 3.5:	Ausbeuten nach Gefriertrocknung der Copigment-HSCCC-Fractionen.....	55
Tab. 3.6:	Übersicht über die mittels HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS bestimmten charakteristischen Daten der in den HSCCC-Fractionen angereicherten Hauptverbindungen.	56
Tab. 3.7:	Nach Gefriertrocknung erhaltene Auswaagen der LSRCCC Fractionen	60
Tab. 3.8:	Übersicht über die per HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS bestimmten charakteristischen Daten wie maximale UV Absorption, Retentionszeit und Fragmentierung der Hauptverbindungen in den LSRCCC-Fractionen.	60
Tab. 3.9:	Ausbeuten und Reinheiten der in den HSCCC-Fractionen angereicherten Copigmente	63
Tab. 3.10:	Übersicht über die Ausbeuten und Reinheiten der in den HSCCC-Fractionen angereicherten Verbindungen.....	64
Tab. 3.11:	¹ H-NMR- und ¹³ C-NMR-Daten von (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(β-D-Glucopyranosyloxy)-pentan-2-yl-(2 <i>E</i>)- <i>p</i> -cumarat. Spektren wurden bei 600 MHz (¹ H-NMR) und 150 MHz (¹³ C-NMR) in CD ₃ OD aufgenommen.	68
Tab. 3.12:	¹ H-NMR- und ¹³ C-NMR-Daten von 10- <i>p-trans</i> -Cumaroyl-1 <i>S</i> -Monotropein. Spektren wurden bei 600 MHz (¹ H-NMR) und 150 MHz (¹³ C-NMR) in CD ₃ OD aufgenommen.	70
Tab. 3.13:	Ausbeuten und Reinheiten der nach Membranchromatographie an Sartobind S75 aus 80 mg aufgegebenem Heidelbeerextrakt erhaltenen Anthocyanfractionen.....	83
Tab. 3.14:	Vergleich der Gehalte an Anthocyanen, Anthocyanidinen und Copigmenten in den Subfraktionen des Heidelbeerextraktes.....	97
Tab. 3.15:	HPLC-DAD und HPLC-ESI MS Daten der im Hibiskusextrakt identifizierten Verbindungen.....	104
Tab. 3.16:	Übersicht über die in den einzelnen HSCCC-Fractionen angereicherten Diglucoside	112
Tab. 3.17:	Überblick über die Gehalte, die antioxidativen Aktivitäten, die Schwellenwerte und Farbbeiträge der Granatapfel-Anthocyane	115
Tab. 3.18:	Masse zu Ladungsverhältnis (<i>m/z</i>) möglicher Fettsäurekombinationen der im Heidelbeertrester enthaltenen Triglyceride.....	118
Tab. 3.19:	Auswaagen der HSCCC-Fractionen des Hexanextraktes aus Heidelbeertrester	119
Tab. 3.20:	Übersicht über die mittels HSCCC fraktionierten, mittels DC detektierten, mittels Säulenchromatographie an Kieselgel isolierten und mittels EI-MS identifizierten Verbindungen aus dem Hexanextrakt des Heidelbeertresters.....	121
Tab. 3.21:	Auswaagen der HSCCC-Fractionen der Trennung des Dichlormethanextraktes.....	124
Tab. 5.1:	Vergleich der Parameter und Herstellerangaben der zur Membranchromatographie verwendeten Membranadsorber.....	134
Tab. 5.2:	Übersicht über die Parameter der durchgeführten HSCCC Trennungen	135
Tab. 5.3:	Übersicht über die Parameter der durchgeführten LSRCCC-Trennungen.....	137
Tab. 5.4:	Bestimmtheitsmaß, Nachweisgrenze und Bestimmtheitsgrenze nach DIN-Norm 32645.....	144
Tab. 5.5:	Herstellung von McIlvaine-Puffer-Lösungen mit pH-Werten zwischen 2,6 und 4,9	150

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

A4F	asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonsäure)
AC	Affinitätschromatographie
arab	arabinosid
BuOH	Butanol
BPC	Base Peak Chromatogram
CCC	Gegenstromverteilungschromatographie (Countercurrent chromatography)
CD ₃ OD	deutერიertes Methanol
CoA	Coenzym A
Cox-2	Cyclooxygenase-2
CQA	Chlorogensäure (Caffeoylquinic acid)
Cy	Cyanidin
d	Dublett
DAD	Diodenarray-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Dublett vom Dublett
ddd	Dublett vom Dublett vom Dublett
Del	Delphinidin
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOH	Ethanol
FA	Farbaktivität
FEI	Forschungskreis der Ernährungsindustrie
FG	Frischgewicht
FM	Fließmittel
GAE	Gallic Acid Equivalent (Gallussäure-Äquivalente)
gal	galactosid
glc	glucosid
h	Stunde
HB	Heidelbeer
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation = $^{2,3}J(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation = $^1J(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$
HPLC	High performance liquid chromatography
HSCCC	High-speed countercurrent chromatography
Hz	Hertz
kDa	Kilodalton
L	Liter
LDL	Low Density Lipoproteine
IEX	Ionenaustauschchromatographie
lat.	lateinisch
J	Symbol für Kopplungskonstante [Hz]
LSRCCC	Low-speed rotary countercurrent chromatography

m	Multipllett
M	Molar
Mal	Malvidin
MALLS-Detektor	Mehrwinkel Lichtstredetektor (multiangle laser light scattering detector)
max	maximal
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minuten
mM	millimolar
MS	Massenspektrum
M _w	Molekulargewicht (molecular weight)
m ü. NN	Meter über Normalnull
<i>m/z</i>	Verhältnis: Masse zu Ladung
n.b.	nicht bestimmt
n.d.	nicht detektiert
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
p.a.	pro analysi (zur Analyse)
pC	<i>p</i> -Hydroxycinnamoyl
Pel	Pelargonidin
Peo	Peonidin
Pet	Petunidin
ppm	parts per million
R	Rest
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffspecies)
R _s	Retention an stationärer Phase
s	Singulett
samb	sambubiosid
TBME	<i>tert</i> -Butylmethylether
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TFA	Trifluoressigsäure
t _R	Retentionszeit
Trolox	6-Hydroxy-2,-5,-7,-8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
Vis	visible (sichtbar)
Vol-%	Volumenprozent
z. B.	zum Beispiel
5-CQA	5-Caffeoylquinic acid (Chlorogensäure)
5-pCuQA	5-p-Coumaroylquinic acid
5-FQA	5-Feruloylquinic acid
δ	chemische Verschiebung [ppm]
Δ	Differenz
λ	Symbol für Wellenlänge

1 Einleitung und Zielsetzung

Obst und Gemüse spielen in einer ausgewogenen und abwechslungsreichen Ernährung eine große Rolle. Neben hohen Gehalten an Vitaminen, wie z. B. Vitamin C und E, sind eine ganze Reihe antioxidativ wirksamer Verbindungen enthalten, die einen wichtigen Beitrag zur Vorbeugung gesundheitlicher Risiken, wie Krebs- und Herz-Kreislaufkrankungen leisten können. Nicht zuletzt deshalb empfiehlt die Deutsche Gesellschaft für Ernährung mindestens fünf Portionen Obst und Gemüse am Tag. Besonders reich an antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen sind die sogenannten „Superfruits“, darunter der Granatapfel, die Frucht der Açaí-Palme oder die Cranberry. Auch die einheimische Wildheidelbeere (*Vaccinium myrtillus*) gehört zu diesen „Superfrüchten“. Ihr wird aufgrund ihres hohen Polyphenolgehaltes ein hoher Beitrag zur Gesundheit nachgesagt. Verantwortlich dafür sind vor allem die farbgebenden Inhaltsstoffe, die Anthocyane, die den größten Teil der in der Heidelbeere enthaltenen Polyphenole ausmachen. Weiterhin sind phenolische Säuren und Flavonole, Proanthocyanidine und polymere Pigmente in der Wildheidelbeere enthalten. Aufgrund dieser Inhaltsstoffe weisen auch die aus der Wildheidelbeere gewonnenen Extrakte hohe Gesamtpolyphenolgehalte und ein hohes antioxidatives Potential auf und es werden ihnen gesundheitsfördernde Effekte zugeschrieben (Prior et al., 1998; Faria et al., 2005). In zahlreichen wissenschaftlichen Studien sind diese gesundheitlich relevanten Wirkungen für die Wildheidelbeere belegt. So konnte z. B. gezeigt werden, dass der Heidelbeerextrakt im Zell- und Tierversuch krebspräventive Wirkungen besitzt (Yi et al., 2005; Darren et al., 2006) und sich zur Therapie von entzündlichen Darmerkrankungen eignet (Knaup et al., 2009).

Alle diese Studien beschäftigen sich jedoch ausschließlich mit der Wirksamkeit der Früchte oder daraus hergestellter Extrakte. Diese beinhalten allerdings ein sehr komplex zusammengesetztes Gemisch von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. Damit drängt sich die Frage auf, welche dieser zahlreichen Inhaltsstoffe oder Inhaltsstofffraktionen tatsächlich für die gesundheitsfördernden Wirkungen der Wildheidelbeere verantwortlich sind. Wie ist die Bioverfügbarkeit oder die biologische Aktivität der einzelnen Polyphenole zu beurteilen? Gibt es womöglich Synergieeffekte zwischen den einzelnen Inhaltsstoffgruppen? Voraussetzung für die Klärung dieser Fragen ist zunächst eine vollständige Isolierung und Strukturaufklärung der in den Heidelbeeren enthaltenen Polyphenole.

Im Rahmen des Clusterprojektes „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“ des Forschungsbereiches der Ernährungsindustrie e. V. FEI (2011) ging es in dieser Arbeit zugrunde liegenden Teilprojekt 1 „Prozessinduzierte Ausbeutesteigerung von wertgebenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffen aus Blaubeeren und Vergleich ihrer Stabilität in Multikapselsystemen gegenüber konventionellen Produkten“ (AiF 15610 N) darum, diesen Fragestellungen nachzugehen.

Ziel war zunächst die Entwicklung einer Methode zur Analytik der Heidelbeerinhaltsstoffe. Neben der vollständigen Charakterisierung eines Heidelbeerextraktes soll die Methode auch als Grundlage zur Erfassung von Veränderungen im Polyphenolprofil von frischen Heidelbeerproben bzw. daraus hergestellten Produkten während des Herstellungsprozesses und der Lagerung dienen. Außerdem soll sie zur Erfassung der prozessinduzierten Ausbeutesteigerung von mit Hochspannungsimpulsen, Hochdruck und Ultraschall behandelten Heidelbeeren und Heidelbeertrestern eingesetzt werden.

Außer der Analytik der Heidelbeerinhaltsstoffe ist die Entwicklung einer Methode zu ihrer vollständigen Fraktionierung und Isolierung notwendig. Neben den Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und biologischen Wirksamkeit, die erst durch die Isolierung gewährleistet werden, sollen die neu entwickelten Isolierungsstrategien die Möglichkeit eröffnen, die empfindlichen Inhaltsstoffe und Inhaltsstofffraktionen, im Rahmen der weiteren Teilprojekte, durch Mikroverkapselung zu stabilisieren und in konzentrierter Form in die gezielt formulierten Verkapselungssysteme einzubringen. Dadurch kann der Transport an den gewünschten Wirkort bzw. die gezielte Freisetzung der konzentrierten Inhaltsstoffe am Ort ihrer größten Resorption realisiert werden.

Bisher erlaubten die verfügbaren präparativen Trennverfahren nur eine teilweise Anreicherung von Anthocyanen, Copigmenten wie z. B. Phenolsäuren und Flavonole sowie von polymeren Extraktbestandteilen, jedoch niemals eine vollständige Trennung. Darüber hinaus verlangen einige weit verbreitete Fraktionierungsstrategien, wie z. B. die Anwendung der Gegenstrom-Verteilungs-Chromatographie (Countercurrent Chromatographie, CCC), die Verwendung perfluorierter Reagenzien (Degenhardt et al., 2000; Winterhalter, 2007), welche die spätere Verwendung der so gewonnenen Extraktfraktionen in Interventionsstudien am Menschen erschweren. Ein weiterer Schwachpunkt der CCC ist, dass die Trennung der Verbindungen ausschließlich auf Verteilungschromatographie basiert. Dies bedeutet, dass Verbindungen mit ähnlichen Verteilungskoeffizienten unabhängig von der Polyphenolklasse koeluieren, was die Herstellung einer 100%ig reinen Anthocyanfraktion praktisch unmöglich macht, da sehr polare Copigmente wie z. B. Chlorogensäure mittels CCC nicht vollständig von den Anthocyanen abgetrennt werden können.

In Anbetracht dessen sollen nicht nur die etablierten Isolierungsstrategien auf das Substrat Heidelbeere angewendet werden, sondern vor allem neue Strategien zur Fraktionierung der Heidelbeerpolyphenole entwickelt werden, die eine möglichst vollständige Trennung der drei Inhaltsstoffgruppen Anthocyane, Copigmente und Polymere gewährleisten. Dazu soll eine membranchromatographische Methode zur Isolierung von Anthocyanen, anhand eines handelsüblichen Membran-Systems, das bisher erfolgreich zur Isolierung von Proteinen eingesetzt wird, entwickelt und optimiert werden. Weiterhin soll untersucht werden, ob sich die Methode auch zur Isolierung von Anthocyanen aus weiteren anthocyanhaltigen Früchten eignet.

2 Grundlagen und Kenntnisstand

2.1 Die europäische Wildheidelbeere (*Vaccinium myrtillus*)

Die Europäische Wildheidelbeere (*Vaccinium myrtillus*) gehört zur Gattung der Heidekrautgewächse (*Ericaceae*) und wird seit alters her in der traditionellen europäischen Medizin, aufgrund ihrer hohen Gehalte an bioaktiven sekundären Pflanzenstoffen, eingesetzt. Das phenolische Inhaltsstoffspektrum umfasst u. a. Phenolsäuren, Flavonole, Procyanidine und Anthocyane. Letztgenannte sind als natürliche Pflanzenfarbstoffe für die blaue Färbung der Beeren verantwortlich (Prior et al., 1998; Häkkinen et al., 1999; Zadernowski et al., 2005; Ichiyanagi et al., 2006; Kalt et al., 2008; Riihinen et al., 2008; Lätti et al., 2011). Die Wildheidelbeere, die umgangssprachlich auch Blaubeere, Schwarzbeere, Moosbeere oder Bickbeere genannt wird, unterscheidet sich von der amerikanischen Heidelbeere (*Vaccinium corymbosum*) sowie der daraus gezüchteten Kulturheidelbeere durch intensive Färbung des Fruchtfleisches. Aufgrund dessen besitzt die Wildheidelbeere im Vergleich zur Kulturheidelbeere einen um mehr als 100% höheren Anthocyangehalt (Kalt et al., 1999). Die Wildheidelbeere ist ein 20 bis 40 cm großer Zwergstrauch, der auf feucht-sauren Waldböden in Sumpf- und Moorlandschaften der nördlichen Hemisphäre beheimatet ist (Abb. 2.1). Die Erntezeit der ca. 1 cm großen Früchte erstreckt sich von Juli bis September. Die reifen Früchte enthalten ca. 85% Wasser, 6% Kohlenhydrate, 5% Ballaststoffe, 1,4% Fruchtsäuren, 0,7% Protein, 0,6% Fett, 0,3% Mineralstoffe und 0,7% Anthocyane (Kähkönen et al., 2003; Senser et al., 2004).



Abb. 2.1: Wildheidelbeere (*Vaccinium myrtillus*) im Bayerischen Wald bei Grafenau (A. Juadjur).

Aufgrund ihres beträchtlichen Polyphenolgehaltes weisen Wildheidelbeeren ein hohes antioxidatives Potential auf und sollen aufgrund ihrer Inhaltsstoffe einen Beitrag zum Schutz vor Herz-Kreislauf-Erkrankungen leisten (Heinonen et al., 1998; Prior et al., 1998; Faria et al., 2005; Heinonen, 2007). In einigen Studien wurde gezeigt, dass polyphenolreiche Heidelbeerextrakte im Zell- und Tierversuch krebsspräventive Wirkungen haben (Yi et al., 2005; Darren et al., 2006). Auch zur Therapie von entzündlichen Darmerkrankungen hat sich die Wildheidelbeere bewährt, indem die darin enthaltenen Anthocyane die Aktivität des humanen Enzyms 5-Lipoxygenase inhibieren (Knaup et al., 2009). In weiteren Studien ergaben sich Hinweise auf präventive Wirkungen bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen, wie Alzheimer und Parkinson (Joseph et al., 2005; de Rivera et al., 2006; Wilson et al., 2006; Duffy et al., 2008).

2.2 Polyphenole

Polyphenole gehören zur Gruppe der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe und haben dort vielfältige Funktionen, die vor allem der Fortpflanzung und Verteidigung dienen. Als Farb-, Gift-, Geruchs- oder Geschmacksstoffe dienen sie der Pflanze einerseits zur geschlechtlichen Fortpflanzung und der Anlockung von Insekten, andererseits aber auch zur Abwehr von Fressfeinden, Pilz- und Bakterieninfektionen (Macheix et al., 1990; Matern und Grimmig, 1993; Rhodes, 1998; Belitz et al., 2008). Außerdem nutzen sie der Pflanze als UV-Schutz und Schutz des „Photosynthese-Apparates“, verhindern als Radikalfänger oxidativen Stress, sind an der Regulation von Eisenkanälen beteiligt und greifen in die Regelung des Pflanzenhormonhaushaltes ein (Matern und Grimmig, 1993; Rhodes, 1998). Der Begriff Polyphenole wird in der Literatur oft uneinheitlich definiert. Der Namensgebung zufolge handelt es sich um Verbindungen mit mindestens 2 aromatischen Ringen, von denen jeder mindestens eine Hydroxylgruppe trägt. Nach dieser Definition würden die Phenolcarbonsäuren als „einfache Phenole“ mit ihrem C₆-C₁-Grundgerüst (Hydroxybenzoesäuren) oder ihrem C₆-C₃-Grundgerüst (Hydroxyzimtsäuren) nicht zu den Polyphenolen gehören und nur die Flavonoide (C₆-C₃-C₆-Grundgerüst), Stilbene (C₆-C₂-C₆-Grundgerüst) und Lignane ((C₆-C₃)₂-Grundgerüst) zu den Polyphenolen zählen. In der nach Manach et al. (2004) sowie Iriti und Faoro (2009) erstellten Klassifizierung (Abb. 2.2) gehören allerdings auch diese nichtflavonoiden Polyphenole dazu.

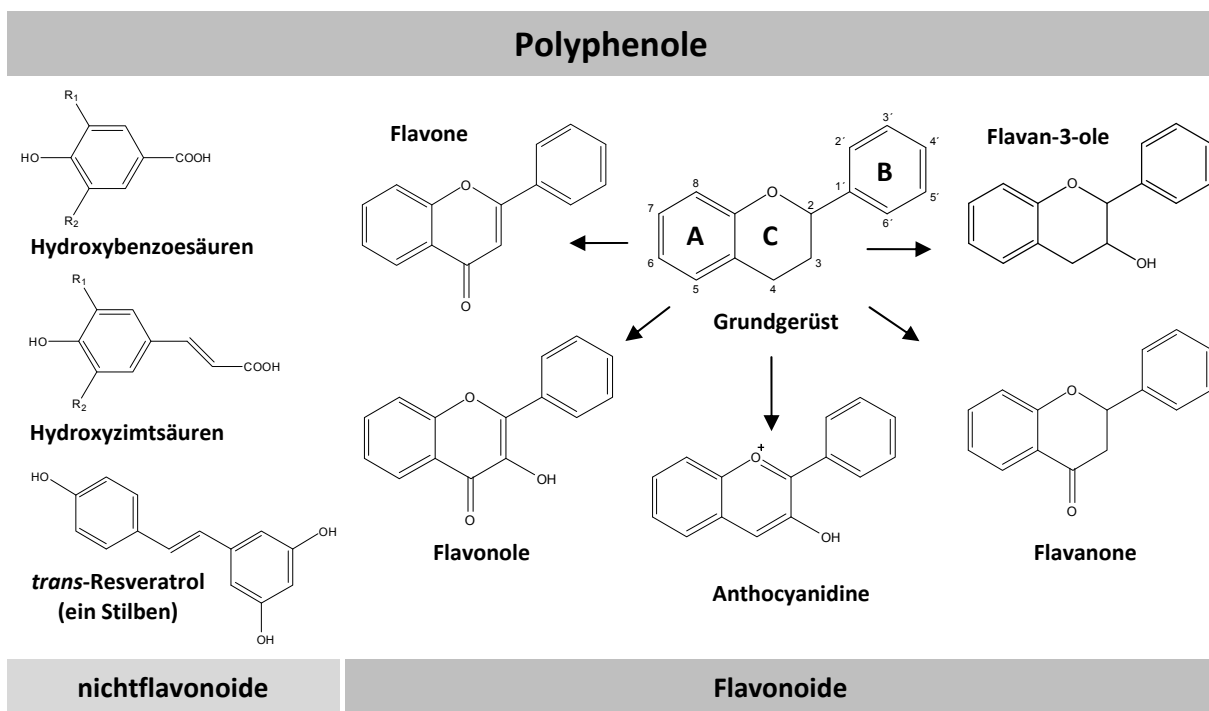


Abb. 2.2: Klassifizierung und Grundgerüst der Polyphenole, modifiziert nach Manach et al. (2004), Crozier et al. (2009), Iriti und Faoro (2009).

Den Flavonoiden kommt aufgrund der großen Vielfalt die größte Bedeutung zu. Einige tausend Flavonoide sind schon in höheren Pflanzen charakterisiert worden und einige Hunderte von ihnen sind in essbaren Pflanzen Bestandteil der menschlichen Ernährung (Watzl und Rechkemmer, 2001; Manach et al., 2004; Crozier et al., 2009).

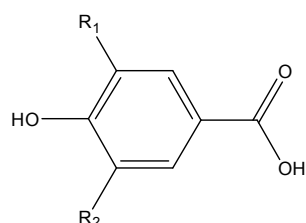
Diese Vielfalt ergibt sich nicht nur durch die unterschiedlichen Oxidationszustände des C-Ringes in die Hauptunterklassen (siehe Abb. 2.2), sondern auch durch die Vielzahl der unterschiedlichen Substitutionspositionen mit Hydroxylgruppen, bevorzugt an den Positionen C4' des B-Ringes sowie C5 und C7 des A-Ringes. Aufgrund der besseren Wasserlöslichkeit kommen die meisten Flavonoide natürlicherweise glykosidisch gebunden in den Pflanzen vor. Bei Anthocyanen, Flavanolen und Flavonolen befindet sich die glykosidische Bindung meistens an der Hydroxylgruppe der Position C3 des C-Ringes (Rice-Evans et al., 1996; Watzl und Rechkemmer, 2001). Abgesehen von den Anthocyanen, die als natürliche Pflanzenfarbstoffe zur Farbe von Blüten, Blättern und Früchten beitragen, sind die meisten Polyphenole farblos. Nur einige Flavonoide besitzen eine gelbe Farbe (lat. *flavus* = gelb). Allerdings können viele von ihnen durch die sogenannte „Copigmentierung“ einen Farbbeitrag leisten.

Schon zu Zeiten des 1. Weltkrieges erkannten Willstätter und Zollinger, dass sich bei der Zugabe von Gallussäure oder anderen Gerbstoffen zu natürlichen Farbstoff-Lösungen aus Wein und Heidelbeeren eine Farbänderung ergibt (Willstätter und Zollinger, 1917). Heute weiß man, dass dieser Effekt auf die intermolekulare Copigmentierung von Anthocyanen mit Polyphenolen zurückzuführen ist. Dabei kommt es zu einer Stabilisierung des für die Farbe der Anthocyane verantwortlichen Flavylumkations. Diese Stabilisierung führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen dem farbigen Flavylumkation und der durch Wassereinlagerung entstehenden farblosen Carbinolbase auf die Seite der farbigen Kationen (vergl. Kapitel 2.2.2.2). Daraus resultiert ein Anstieg der Farbintensität (hyperchromer Effekt). Außerdem kann es durch Copigmentierung und Komplexbildung mit Metallen zu Verschiebungen des Absorptionsmaximums in den langwelligeren Bereich (bathochromer Effekt) oder zu einer Blauverschiebung (hypsochromer Effekt) in den kurzwelligeren Bereich kommen (Asen et al., 1972; Mazza und Brouillard, 1990; Wilska-Jeszka und Korzuchowska, 1996; Markovic et al., 2000). Unter den Polyphenolen können vor allem Flavonoide und Phenolsäuren als Copigmente fungieren, weshalb die Gesamtheit dieser farbstabilisierenden Verbindungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Einfachheit halber und zum besseren Verständnis als „Copigmentfraktion“ bezeichnet wird.

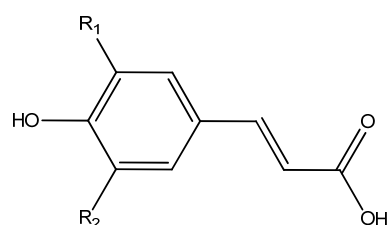
2.2.1 Phenolsäuren

Die Hydroxybenzoesäuren (C₆-C₁-Grundkörper) und Hydroxyzimtsäuren (C₆-C₃-Grundkörper) umfassende Gruppe der Phenolsäuren ist nach den Flavonoiden die zweitgrößte Gruppe unter den phenolischen Inhaltsstoffen in Lebensmitteln. Phenolsäuren sind in fast allen Beeren und vielen Obst- und Gemüsesorten, wie z. B. in Heidelbeeren, Brombeeren, Himbeeren, Cranberry, Kirschen, Weintrauben, Kiwis, Pflaumen, Äpfeln, Kartoffeln und Brokkoli enthalten (Perez-Jimenez et al., 2010). Abb. 2.3 zeigt die chemische Struktur der jeweils vier häufigsten Vertreter aus beiden Gruppen (Fabre et al., 2001). Während die Hydroxybenzoesäuren seltener und nur in geringen Konzentrationen in den Pflanzen zu finden sind, kommen die Hydroxyzimtsäuren verbreitet vor. Die vier bedeutendsten Vertreter unter ihnen sind Kaffee-, *p*-Cumar-, Ferula- und Sinapinsäure, die in den Pflanzen meist als Chinasäure-, Weinsäure-, Shikimisäure- oder Glucose-Ester vorliegen und erst während der Aufarbeitung durch Hydrolyse freigesetzt werden. Die bedeutendste unter ihnen ist die Kaffeesäure, die in vielen Früchten in freier und veresterter Form mehr als 75% des Gesamthydroxyzimtsäuregehaltes ausmacht. Sehr oft ist die Kaffeesäure mit Chinasäure verestert und ist so als Chlorogensäure in vielen Früchten sowie in hohen Konzentrationen auch im Kaffee anzutreffen. Sie soll neben dem Coffein für die anregende Wirkung des Kaffees mitverantwortlich

sein. Das Profil der Chlorogensäureisomere, Caffeoyl-, Feruloyl- und DicaFFEoylchinasäureester, die 98% des Chlorogensäuregehaltes im Kaffee ausmachen, ist ein wichtiges Merkmal für die Qualität des Kaffees (Macheix et al., 1990; Moreira et al., 2001; Watzl und Rechkemmer, 2001; Clifford et al., 2003; Manach et al., 2004; Crozier et al., 2009).



Hydroxybenzoesäuren	R ₁	R ₂
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure	H	H
Protocatechusäure	OH	H
Vanillinsäure	OCH ₃	H
Gallussäure	OH	OH



Hydroxycimtsäuren	R ₁	R ₂
<i>p</i> -Cumarsäure	H	H
Kaffeesäure	OH	H
Ferulasäure	OCH ₃	H
Sinapinsäure	OCH ₃	OCH ₃

Abb. 2.3: Chemische Struktur der wichtigsten Hydroxybenzoe- und Hydroxycimtsäuren.

Die Ester aus zwei Phenolsäuren werden auch Depside genannt. Neben den Chlorogensäuren sind auch weitere Kondensationsprodukte aus zwei Phenolcarbonsäuren bekannt, wie z. B. das 2-O-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxyphenylmethylacetat aus Cranberry (Abb. 2.4). Die Depside besitzen einigen Studien zufolge neben einer hohen antioxidativen Aktivität auch antibiotische und antiproliferative Eigenschaften. Außerdem sollen einige unter ihnen die Integrase von Retroviren hemmen und auf diese Weise eine Wirksamkeit gegen HIV besitzen (Neamati et al., 1997; Kumar und Muller, 1999; Hillenbrand et al., 2004; Reynertson et al., 2006; Turner et al., 2007).

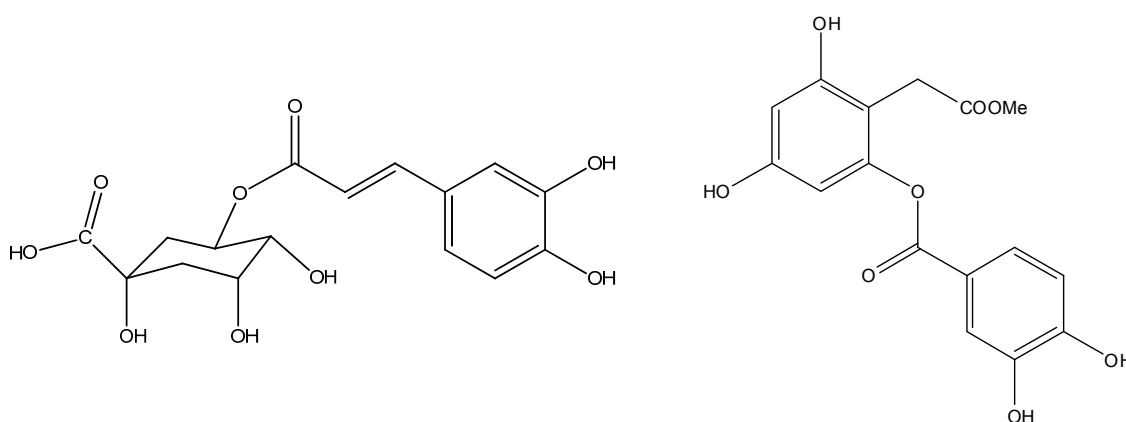


Abb. 2.4: Chemische Struktur von Chlorogensäure (5-Caffeoyl-(D)-Chinasäure; links) und 2-O-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxyphenylmethylacetat (rechts), ein aus Cranberry isoliertes Depsid (Turner et al., 2007).

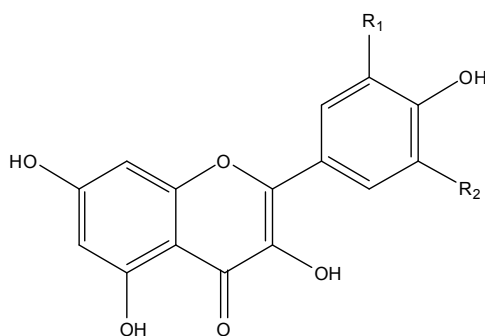
Die nicht so verbreiteten Hydroxybenzoesäuren sind in vielen Beeren sowie in hohen Mengen in Kastanien und Granatäpfeln zu finden (Perez-Jimenez et al., 2010). Dort kommen sie natürlich vor, sind aber auch als Abbauprodukte von Anthocyanen (vergl. Kapitel 2.2.2.2) vorzufinden (Markakis und Jurd, 1974).

2.2.2 Flavonoide

Die Flavonoide, deren Struktur sich vom Flavangrundgerüst (2-Phenylbenzodihydropyran), einem C₆-C₃-C₆ Grundkörper, ableitet, bilden die wichtigste Gruppe unter den phenolischen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. Es sind etwa 9000 verschiedene Flavonoide bekannt, die sich aus den unterschiedlichen Hydroxylierungs- und Methylierungspositionen der in Abb. 2.2 gezeigten Grundstrukturen sowie deren glykosidischer Konjugate ergeben. Unter den bioaktiven Komponenten der Wildheidelbeere sind neben den Phenolsäuren vor allem die Flavonole und die Anthocyane von besonderer Bedeutung.

2.2.2.1 Flavonole

Flavonole (Abb. 2.5) kommen in großen Mengen in Blaubeeren, grünem Tee, Grünkohl, Zwiebeln und Brokkoli vor und sind die verbreitetste Gruppe unter den Flavonoiden. Sie sind für die gelbe Farbe (lat. *flavus* = gelb) vieler Pflanzen und Blüten verantwortlich (Watzl und Rechkemmer, 2001; Crozier et al., 2009). Besonders Quercetin- und Kämpferol-Konjugate sind in der Natur sehr weit verbreitet. Quercetin kommt unter anderem in großen Mengen in Äpfeln, Kapern und Liebstöckel vor. Auch in der Heidelbeere sind hohe Gehalte an Flavonolen, vor allem Quercetin- und Myricetin-Glykoside enthalten, die neben den Anthocyanen und Phenolsäuren zu den gefundenen Bioaktivitäten phenolreicher Heidelbeerextrakte beitragen könnten. Neben den verschiedenen Glykosylierungsformen, vor allem 3-O-Glykoside und -Diglykoside wie z. B. Rutin (Quercetin-3-O-rhamnosyl-Glucosid), sind auch Glucuronide bekannt (Watzl und Rechkemmer, 2001; Manach et al., 2004).



Flavonole	R ₁	R ₂
Myricetin	OH	OH
Quercetin	OH	H
Kämpferol	H	H
Isorhamnetin	OCH ₃	H

Abb. 2.5: Chemische Struktur der wichtigsten Flavonole.

Flavonole wie Quercetin und Myricetin wirken als starke Radikalfänger, können Metallionen binden und zeigen antiinflammatorische Aktivitäten (Ferrali et al., 1997; Boots et al., 2008). Neben der hohen antioxidativen Aktivität konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass Quercetin eine bedeutende Rolle bei der Hemmung von Brust- und Darmkrebszellen spielt (Yoshida et al., 1990;

Avila et al., 1994; Shan et al., 2009). In einer Studie konnte z. B. gezeigt werden, dass Quercetin die Apoptose, ein „Selbstmordprogramm“ in menschlichen Brust- und Darmkrebszellen, fördert (Zhang et al., 2012). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass durch die Supplementierung mit Quercetin die Barrierefunktion im Dün- und Dickdarm von Ratten unterstützt und vor Zytokin-induzierten Barrierschäden geschützt wird (Amasheh et al., 2012). Außerdem soll eine hohe diätische Zufuhr von Quercetin das Risiko für Magenkarzinome senken. Dieser Effekt macht sich besonders bei Frauen bemerkbar, die stark oxidativem Stress ausgesetzt sind, wie er z. B. durch Rauchen hervorgerufen wird (Ekstrom et al., 2011).

2.2.2.2 Anthocyane

Die Bezeichnung Anthocyane leitet sich aus dem Griechischen ab und bedeutet: Anthos = Blüte, kyanos = Blau. Anthocyane sind als natürliche Pflanzenfarbstoffe für die roten, violetten und blauen (Abb. 2.6) Farben der meisten Blüten, Blätter, Früchte, Gemüse und Körner verantwortlich (Mazza und Miniati, 1993). Sie sind bevorzugt in den Randschichten zu finden und dienen der Pflanze zum einen als Farb- und Lockstoffe, die zur Verbreitung durch Insekten und Tiere beitragen, zum anderen stellen sie für die Pflanze einen wirksamen UV-Schutz dar.



Abb. 2.6: Die Kornblume (*Centaurea cyanus*) erhält ihre leuchtend blaue Farbe durch Protocyanin (siehe Seite 12), ein Metallkomplex aus sechs Anthocyan- und sechs Flavonmolekülen (A. Juadjur).

Nicht nur aufgrund ihres Einsatzes als natürliche Lebensmittelfarbstoffe in gut gekühlten oder säuerlichen Lebensmitteln wie Speiseeis oder Konfitüre, sondern auch wegen ihres Nutzens als biologisch aktive sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe im Functional Food Bereich, ist das Interesse an Anthocyanen in den letzten Jahren kontinuierlich gestiegen. Denn unter den Polyphenolen besitzen die Anthocyane ein besonders breites Bioaktivitätsspektrum. Neben ihrem hohen antioxidativen Potential (Fukumoto und Mazza, 2000; Mazza et al., 2002) besitzen sie antimikrobielle (Cisowska et al., 2011), neuroprotektive (Galli et al., 2002), entzündliche (Wang et al., 1999; Youdim et al., 2002) und antikarzinogene Aktivitäten (Kang et al., 2003). Die entzündlichen Wirkungen sind *in vitro* und *in vivo* Studien durch Hemmung der Cyclooxygenase-2 (Cox-2) belegt. Cox-2-Inhibitoren hemmen die Thrombozytenaggregation durch Verringerung der Prostacyclin-Synthese und wirken vasodilatatorisch (gefäßerweiternd). Dabei ist die Wirkung vergleichbar mit derjenigen von

entzündungshemmenden Schmerzmitteln wie Naproxan und Ibuprofen, was auf einen Einsatz von Anthocyanen als entzündungshemmendes Analgetikum hoffen lässt (Mitchell et al., 1994; Seeram et al., 2001; Hwang et al., 2011). Die antikanzerogenen Wirkungen beruhen unter anderem auf der Induktion der Apoptose bei bereits mutierten Zellen sowie auf antiproliferativen Effekten (Katsube et al., 2003; Olsson et al., 2006; Netzel et al., 2007; Wang und Stoner, 2008). Außerdem konnte gezeigt werden, dass es durch Anthocyane zu einer Maskierung von Bindungsstellen an der DNA für kanzerogene Verbindungen kommt (Mas et al., 2000). Besonders auf die Darmgesundheit sollen sich Anthocyane positiv auswirken, denn neben der darmkrebshemmenden Wirkung durch Hemmung der Entstehung von Adenomen (Darmkrebsvorstufen) (Zhao et al., 2004; Yi et al., 2005; Darren et al., 2006) werden auch chronische Leiden wie Morbus Crohn mit anthocyanhaltigen Extrakten therapiert (Knaup et al., 2009). Weiterhin wurde gezeigt, dass Anthocyane positiv zur Sehkraft beitragen können, indem sie Kurzsichtigkeit und Diabetes bedingten Retinaerkrankungen entgegenwirken, sowie die Regeneration von Rhodopsin, eines der Sehpigmente der Netzhaut, fördern (Matsumoto et al., 2003). Da Rhodopsin in den Stäbchen der Netzhaut für das hell/dunkel Sehen verantwortlich ist, werden anthocyanreiche Heidelbeerextrakte bereits in Form von Kapseln und Tabletten als Nahrungsergänzungsmittel bei Patienten mit Nachtblindheit und altersbedingter Makuladegeneration eingesetzt (Ghosh und Konishi, 2007).

Anthocyane bestehen aus einem 2-Phenylbenzopyryliumkation, welches als Chromophor für die Farbe des Moleküls verantwortlich ist, sowie aus einem oder mehreren Zuckerbausteinen. Bei den konjugierten Zuckern handelt es sich oft um Glucose, Galaktose, Arabinose oder Xylose, aber auch Disaccharide wie z. B. Sambubiose und Rutinose und auch Trisaccharide kommen vor. Das Aglykon bzw. die nicht glykosylierte Form wird als Anthocyanidin bezeichnet. Die verschiedenen Aglykone unterscheiden sich durch unterschiedliche Substitutionsmuster mit Hydroxyl- bzw. Methoxygruppen am B-Ring (Abb. 2.7).

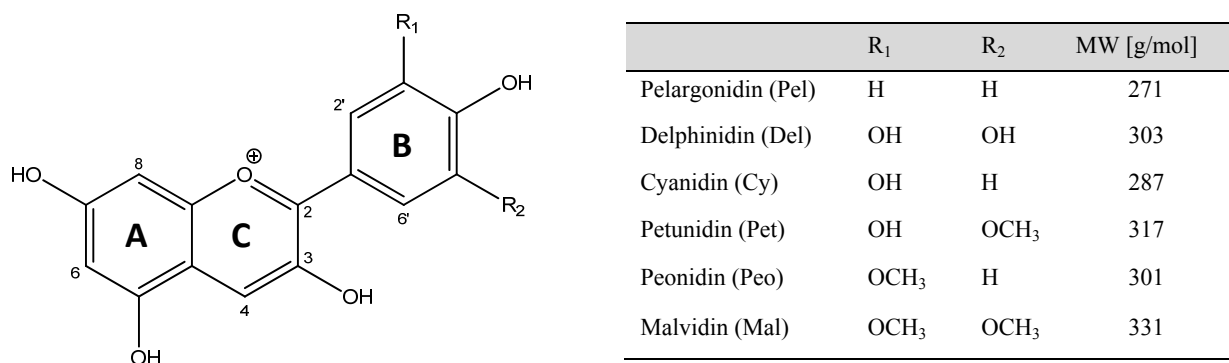


Abb. 2.7: Chemische Strukturen der wichtigsten natürlich vorkommenden Anthocyanidine.

In den Pflanzen kommen natürlicherweise nur die glykosylierten Formen, die Anthocyane, vor. Die Glykosylierung führt zu einer Stabilisierung des Moleküls und zu einer Verbesserung der Wasserlöslichkeit und findet meist an der Position C3, seltener an den Positionen C5 und C7 statt (Wrolstad, 2004; Wang et al., 2010). Auch Acetylierungen mit Hydroxyzimtsäuren, z. B. *p*-Cumarsäure oder Kaffeesäure sind möglich (Macheix et al., 1990; Mazza und Miniati, 1993). Aus all diesen Kombinationsmöglichkeiten ergibt sich die große Anzahl von über 600 bekannten Verbindungen. Damit sind die Anthocyane die größte Gruppe unter den wasserlöslichen Pflanzenfarbstoffen.

(Clifford, 2000; He und Giusti, 2010). Die verschiedenen Substitutionsmuster und Glykosylierungen haben Auswirkungen auf die Farbe der Anthocyane. Eine steigende Anzahl an Hydroxylgruppen am B-Ring führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu größeren Wellenlängen (bathochromer Effekt). Methoxygruppen bewirken hingegen eine Blauverschiebung zu kleineren Wellenlängen (hypsochromer Effekt) (Mazza und Miniati, 1993; Clifford, 2000). Die Farbe und Stabilität der Anthocyane hängt allerdings nicht nur von den verschiedenen Substituenten ab, sondern auch äußere Faktoren, wie pH-Wert, Licht, Sauerstoff, Temperatur, Metallionen, Enzyme und Copigmente haben einen entscheidenden Einfluss (Mazza und Brouillard, 1990; Wilska-Jeszka und Korzuchowska, 1996; Fossen et al., 1998; Rein und Heinonen, 2004). Von besonders großer Bedeutung ist der pH-Wert, der neben einer Farb- auch eine Strukturänderung der Anthocyane bewirkt. Die in Abb. 2.8 gezeigten Formen liegen in anthocyanhaltigen Lösungen in einem Gleichgewicht vor. Je nach pH-Wert verschiebt sich dieses Gleichgewicht in die Richtung der gezeigten Einzelstrukturen. Bei pH-Werten unter 3 liegen die Anthocyane als positiv geladene Flavylumkation mit roter Farbe vor. Bei steigendem pH-Wert entsteht in einer Hydrationsreaktion (pH 4-5) entweder eine farblose Carbinolbase (Pseudobase) oder hervorgerufen durch einen Protonentransfer an einer der aziden Hydroxylgruppen (pH 6-7) eine violette chinoide Base. Aus beiden Verbindungen geht bei pH 7-8 durch Ringöffnung das gelb gefärbte Chalkon hervor (Mazza und Miniati, 1993; Fossen et al., 1998; Lapidot et al., 1999).

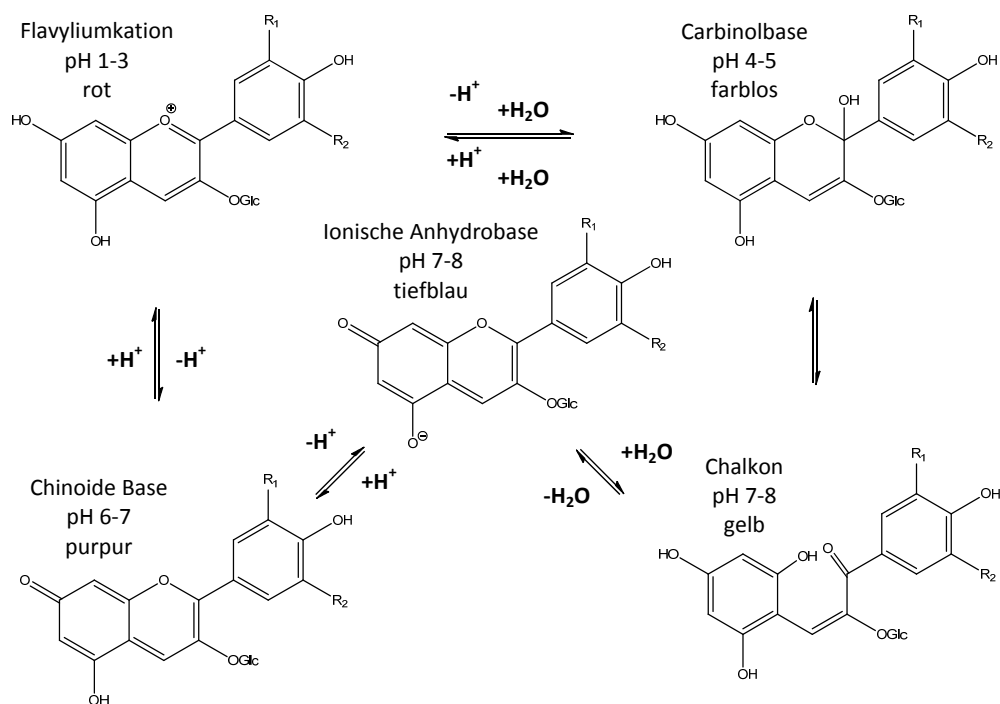


Abb. 2.8: Struktur- und Farbänderung der Anthocyane in Abhängigkeit vom pH-Wert in Anlehnung an Mazza und Miniati (1993), Lapidot et al. (1999).

Anthocyane sind nicht sehr stabil und können daher nicht in allen Produkten als Lebensmittelfarbstoffe eingesetzt werden. Bei höheren pH-Werten erfolgt nach der Bildung des Chalkons eine Umlagerung durch Keto-Enol-Tautomerie zu einem α -Diketon (siehe Abb. 2.9). Das α -Diketon ist sehr instabil und zerfällt durch hydrolytische Spaltung sofort in die korrespondierende Phenolcarbonsäure und Phloroglucinolaldehyd (2,4,6-Trihydroxy-benzaldehyd) (Markakis und Jurd,

1974; Mazza und Miniati, 1993). Die Geschwindigkeit dieses Zerfalls ist pH- (Gleichgewicht zwischen dem Chalkon, dem Flavylumkation sowie den anderen Formen) und temperaturabhängig. Mit steigender Temperatur bei ansonsten konstanten Bedingungen nimmt der Anthocyanabbau sehr schnell zu (Sadilova et al., 2007; Yue und Xu, 2008). Dagegen hat die Glykosylierung an der Position C3 einen stabilisierenden Effekt zur Folge und verlangsamt die Degradationsgeschwindigkeit deutlich (Fleschhut et al., 2006; Yue und Xu, 2008). Bei der intramolekularen Copigmentierung, bei der Copigmente über den Zucker an das Anthocyan-Molekül gebunden werden, findet eine zusätzliche Stabilisierung dadurch statt, dass die Acylgruppe das Anthocyangrundgerüst vor hydrolytischen Angriffen schützt (Dangles et al., 1993; Giusti und Wrolstad, 2003).

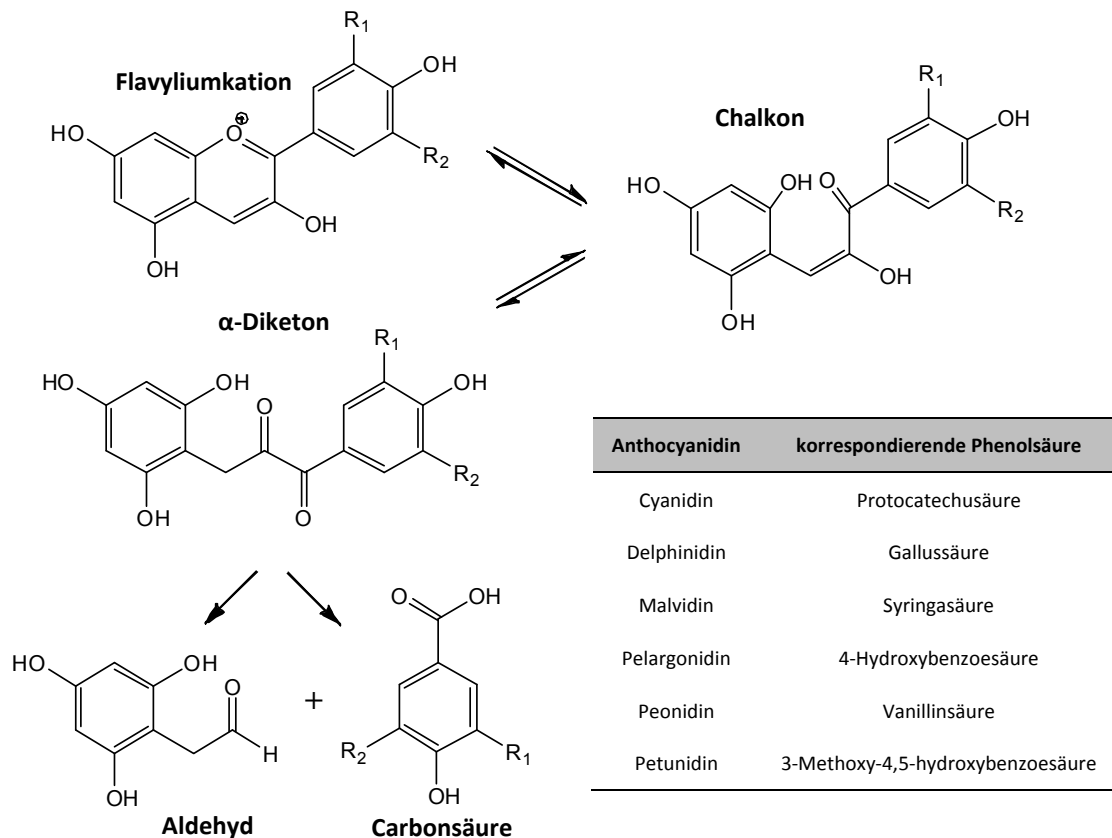


Abb. 2.9: Degradation der Anthocyanidine in Anlehnung an Fleschhut et al. (2006), Sadilova et al. (2007).

Neben der Degradation kann auch die Dimerisation bzw. Polymerisation der Anthocyane untereinander und mit vielen weiteren phenolischen Inhaltsstoffen zu Anthocyanverlusten unter Bildung braun gefärbter Pigmente führen (Brownmiller et al., 2008). Viele Forschungsprojekte beschäftigen sich mit dem genauen Mechanismus sowie der Strukturaufklärung der polymeren Verbindungen, denn viele Fragen sind bis zum heutigen Zeitpunkt noch ungeklärt. Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft der Anthocyane zu den Flavan-3-olen wird vermutet, dass der Mechanismus analog der Bildung der Proanthocyanidine verläuft (Dixon et al., 2005). Eine weitere Möglichkeit der Polymerisierung stellt die Acetaldehyd-induzierte Reaktion der Anthocyane und anderer phenolischer Inhaltsstoffe zu Methylmethin-verbrückten Dimeren oder Anthocyan-Tannin-Produkten dar (Remy et al., 2000; Rentzsch, 2008; Weber, 2012). Die Analytik der höhermolekularen Polymere gestaltet sich jedoch sehr schwierig. Für die Analytik dieser hochkomplexen Verbindungen fehlen geeignete Methoden zur Charakterisierung, so dass wenig über die Zusammensetzung und Molekulargröße bekannt ist. Im Gegensatz zu polymeren Proanthocyanidinen, die zu analytischen

Zwecken durch eine säurekatalysierte Degradation (Phloroglucinolyse) in ihre einzelnen Bausteine zerlegt oder auch semisynthetisch zu Dimeren umgesetzt werden können (Esatbeyoglu, 2011), lassen sich die bräunlichen Alterungsprodukte der Anthocyane nicht aufspalten und nur sehr schwer charakterisieren (Quast, 2008; Weber, 2012).

Anthocyane mit zwei ortho-ständigen Hydroxylgruppen am B-Ring sind zur Komplexbildung mit zwei- und dreiwertigen Metallionen wie z. B. mit Magnesium (Mg^{2+}), Aluminium (Al^{3+}) und Eisen (Fe^{3+}) fähig. Diese Anthocyan-Metall-Komplexe führen ebenfalls zu einer Blauverschiebung des Absorptionsspektrums (hypsochromer Effekt) und sind die Grundlage vieler Blütenfarbstoffe, wie sie beispielsweise in der Kornblume (*Centaurea cyanus*) oder der Gemeinen Tagblume (*Commelina communis*) vorkommen (Bayer et al., 1966; Goto und Kondo, 1991; Cavalcanti et al., 2011). Für das Commelinin, den blauen Farbstoff der gemeinen Tagblume, postulierte Hayashi 1970 den folgenden Komplex (Abb. 2.10):

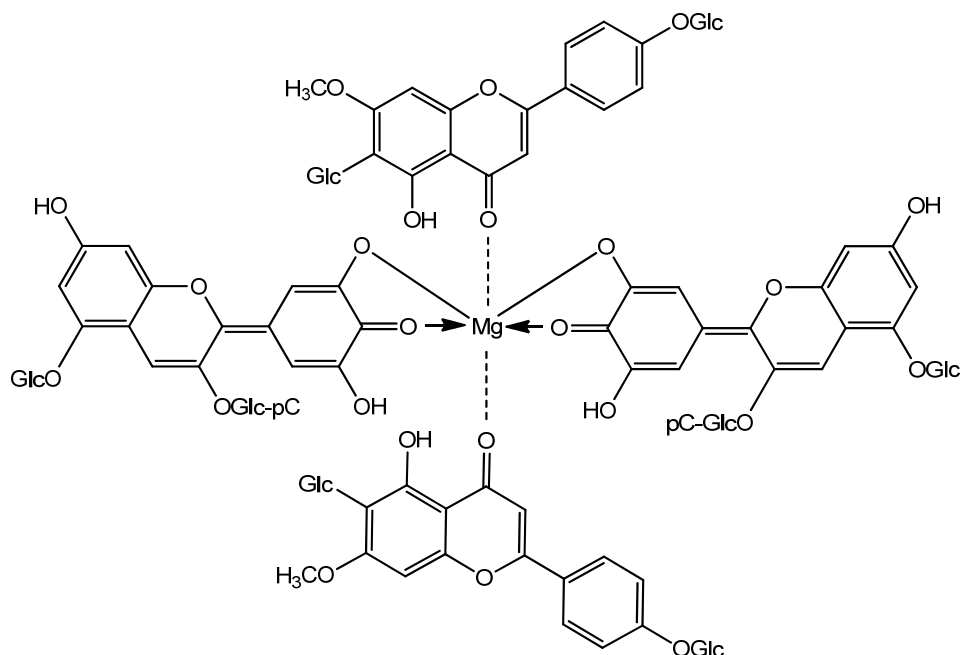


Abb. 2.10: 1970 von Hayashi et al. postulierter Anthocyan-, Flavon-, Magnesiumkomplex für Commelinin, den leuchtend blauen Pflanzenfarbstoff der gemeinen Tagblume (Goto und Kondo, 1991).

Heute ist bekannt, dass der Farbstoff der Kornblume (das Protocyanin) und der Farbstoff der Gemeinen Tagblume (das Commelinin) Metallkomplexe sind, die sich aus jeweils sechs Anthocyan- und sechs Flavonmolekülen zusammensetzen und ein Molekulargewicht von fast 10000 u besitzen. Die Struktur von Commelinin konnte erst jüngst durch Röntgenkristallstrukturanalyse geklärt werden. Es handelt sich um einen tetranuklearen Metallkomplex aus vier Mg^{2+} -Ionen, wobei zwei Mg^{2+} -Ionen durch sechs Anthocyanmoleküle und weitere zwei Mg^{2+} -Ionen durch sechs Flavonmoleküle komplexiert werden (Goto und Kondo, 1991; Shiono et al., 2008). Auch aktuelle Studien beschäftigen sich mit der Komplexbildung von Anthocyanen und Übergangsmetallen. Die Bildung des Komplexes aus Aluminium-Ionen (Al^{3+}) und Delphinidin wurde 2010 untersucht und erfolgt in Schritt 1 durch die Bildung der anionischen Anhydrobase. Diese bildet mit dem Aluminium-Ion (Al^{3+}) einen Komplex, der durch π - π -Wechselwirkungen eines zweiten Delphinidin-Flavyliumkations stabilisiert wird (Schreiber et al., 2010).

Auch bei der Stabilisierung und Farbänderung der Flavylumkationen durch intramolekulare Copigmentierung (Copigmente sind kovalent an das Anthocyan gebunden) und durch die intermolekulare Copigmentierung (Anthocyane und Copigmente liegen in freier Form vor) von Anthocyanen mit Flavonoiden, Phenolsäuren und anderen aromatischen Molekülen spielen π - π -Wechselwirkungen durch Stapelung der planar angeordneten Flavylumkationen mit Copigmenten, z. B. Hydroxybenzoe- und Hydroxyzimtsäuren, eine Rolle (Asen et al., 1972; Mazza und Brouillard, 1990; Dangles et al., 1993; Giusti und Wrolstad, 2003). Durch die schwache π -komplexartige Interaktion zwischen den aromatischen Kernen kommt es neben einer Verstärkung der Absorption durch die Stabilisierung der Flavylumkationen (hyperchromer Effekt) zu einem bathochromen Effekt. Welcher der beiden Effekte eintritt, ist nicht aus der Struktur des Copigments vorhersehbar und oftmals treten auch beide Effekte gleichzeitig auf. Der hyperchrome Effekt wird in wässrigen Lösungen durch Anlagerung von H_2O Molekülen um den Anthocyan-Copigment-Komplex erklärt, der zu einem engeren Kontakt der beiden Moleküle und zu einer Stabilisierung des Flavylumkations führt. Der bathochrome Effekt wird auf weniger polare Copigmente zurückgeführt, die durch eine Polaritätsänderung in der näheren Umgebung des Flavylumkations die H_2O Moleküle verdrängen (Asen et al., 1972; Mazza und Brouillard, 1990; Dangles et al., 1993; Brouillard et al., 2010). Auch die Stapelung von Anthocyanen führt zu einer Stabilisierung der Anthocyane und einer Erhöhung der Farbintensität. Durch diese Selbstassoziation erfolgt mit steigender Anthocyankonzentration eine positive Abweichung vom Lambert-Beerschen-Gesetz. Außer der nicht mehr vorhandenen Linearität durch einen steileren Anstieg der Farbintensität bei zunehmender Anthocyankonzentration kommt es zusätzlich zu einer hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums (Hoshino et al., 1981; Boulton, 2001; Cavalcanti et al., 2011).

Aufgrund der gesundheitlichen Wirkungen und bedingt durch die Instabilität der Anthocyane wird zurzeit intensiv an verschiedenen Stabilisierungsmaßnahmen geforscht, um die bioaktiven Anthocyane als natürliche Pflanzenfarbstoffe oder bioaktive Komponenten (Nutraceuticals) in funktionelle Lebensmittel einbringen zu können. Dabei werden zum einen natürliche Stabilisierungsmechanismen wie Copigmentierung, Selbstassoziation und Metallkomplexbildung eingesetzt, zum anderen aber auch innovative Stabilisierungstechniken, wie die Mikroverkapselung verwendet. Dadurch sollen die Anthocyane gegen äußere Einflüsse stabilisiert an den jeweils gewünschten Wirkort, z. B. den Dickdarm gebracht werden. Das Clusterprojekt „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“ ist ein solches Forschungsprojekt (FEI). Als Grundlage für ein solches Projekt sind Methoden zur begleitenden Analytik sowie zur Strukturaufklärung und Isolierung der bioaktiven Komponenten zwingend erforderlich. Nur so können Anthocyane und andere Inhaltsstoffe isoliert, Untersuchungen hinsichtlich der Stabilität, Bioverfügbarkeit und -aktivität realisiert und geeignete Kapselsysteme zum Einbringen der konzentrierten Inhaltsstoffe in das Lebens- bzw. Nahrungsergänzungsmittel gefunden werden.

2.2.3 Biosynthese von Anthocyanen und anderen Polyphenolen

Die Biosynthese der Polyphenole hat ihren Ursprung im Kohlenhydratstoffwechsel der Pflanze und ist in Abb. 2.11 gezeigt. Über den Shikimisäureweg wird in mehreren Reaktionsschritten aus Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat die Shikimisäure (C_6-C_1) gebildet (Herrmann, 1995). Der Shikimisäureweg liefert nicht nur das Ausgangsprodukt für die Synthese der proteinogenen aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, sondern ist auch der Startpunkt des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels.

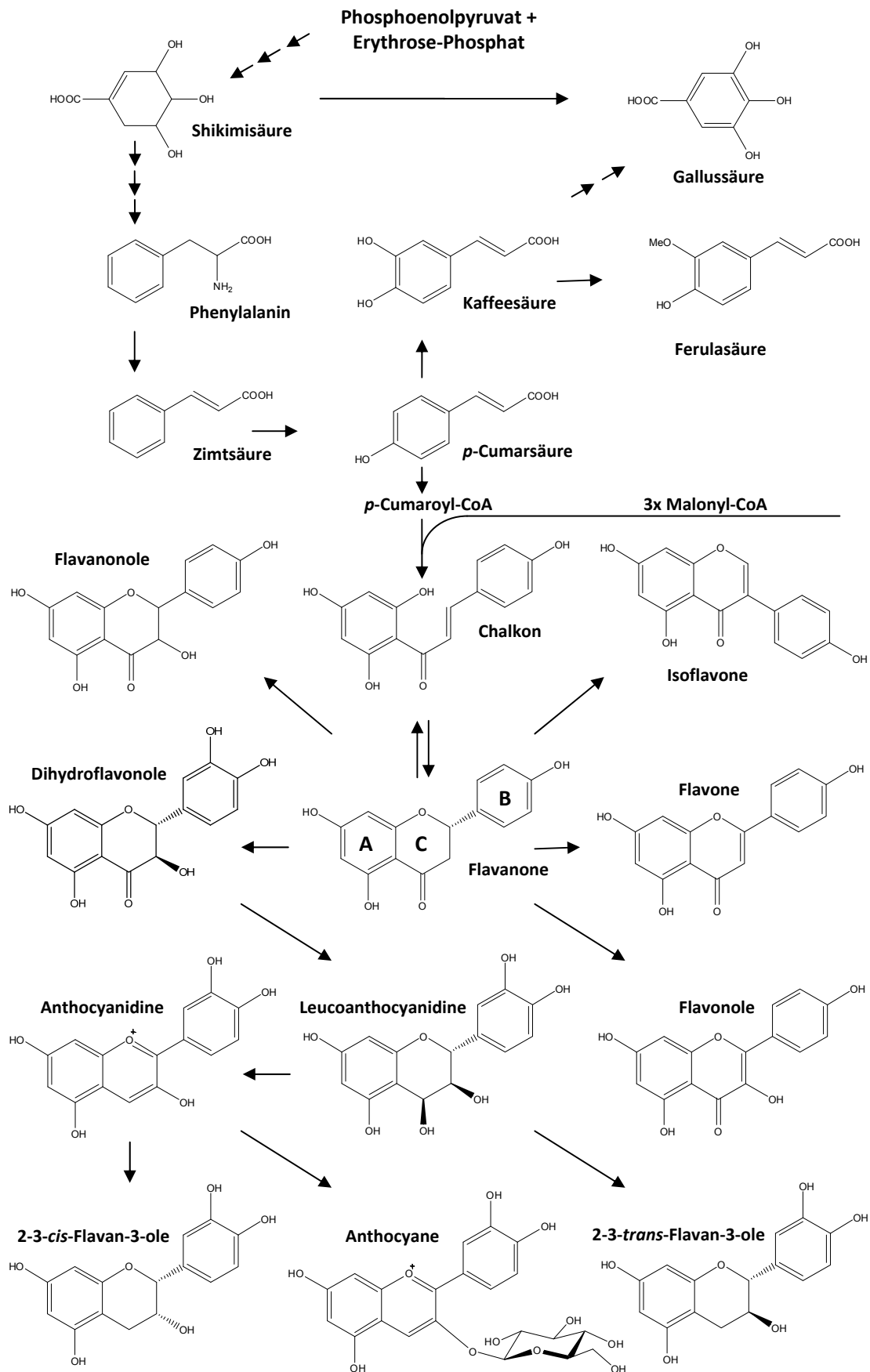


Abb. 2.11: Biosynthese der Polyphenole in Anlehnung an Macheix et al. (1990), Tanner et al. (2003), Crozier et al. (2009).

Dabei werden aus der Shikimisäure in mehreren Reaktionsschritten die drei Aminosäuren gebildet. Aus einem Anteil des Phenylalanins, der nicht zum Proteinaufbau benötigt wird, entsteht durch Desaminierung zunächst die Zimtsäure, aus welcher in einem nächsten Schritt durch Hydroxylierung die *p*-Cumarsäure (C₆-C₃) gebildet wird. Durch weitere Hydroxylierungen bzw. Methylierungen entstehen weitere Hydroxyzimtsäurederivate wie z. B. Kaffee- oder Ferulasäure. Aus den Hydroxyzimtsäurederivaten können im Anschluss durch β -Oxidation die Hydroxybenzoesäuren wie z. B. die Gallussäure gebildet werden. Die Hydroxybenzoesäuren können aber auch direkt aus der Shikimisäure entstehen (Crozier et al., 2009).

Die Biosynthese der Flavonoide erfolgt ausgehend von der *p*-Cumarsäure. Durch Aktivierung mit Coenzym A entsteht aus dem CoA-Cumarsäure-Ester und drei Äquivalenten Malonyl-CoA das Naringeninchalkon durch die Chalkonsynthase. Der B-Ring dieses Chalkons sowie die Verbindung zum C-Ring gehen auf die aktivierte *p*-Cumarsäure zurück, während der A-Ring aus den Malonyl-CoA-Einheiten gebildet wird. Durch einen anschließenden Isomerisierungsschritt entsteht schließlich ein Flavanon (C₆-C₃-C₆-Grundkörper) als Ausgangsprodukt für die Bildung zahlreicher Flavonoide (Macheix et al., 1990; Crozier et al., 2009).

Im Folgenden ist die weitere Biosynthese der Anthocyane beschrieben. Auf alle weiteren Synthesewege der einzelnen Flavonoide wird nicht weiter eingegangen, sie sind z. B. bei Macheix et al. (1990) und Crozier et al. (2009) beschrieben. Die Biosynthese der Anthocyane erfolgt im Anschluss an den Flavonoid-Weg. Dabei werden aus den Flavanonen durch die Flavanon-3- sowie weitere Hydroxylasen die Dihydroflavonole wie z. B. das Dihydroquercetin gebildet. Aus den Dihydroflavonolen gehen durch die Dihydroflavonolreduktase die Flavan-3,4-diole hervor. Diese 2R, 3S, 4S-Leucoanthocyanidine (z. B. Leucocyanidin) sind das Ausgangsprodukt für die Bildung der Flavan-3-ole und der Anthocyane. Auf dem Weg zu den Anthocyanen werden zunächst durch die Anthocyanidinsynthase die Anthocyanidine (z. B. Cyanidin) gebildet, bevor durch die Anthocyanidinglycosyltransferase die Anthocyane entstehen (z. B. Cyanidin-3-glucosid) (Tanner et al., 2003; Crozier et al., 2009).

2.2.4 Antioxidative Aktivität

Begriffe wie „freie Radikale“, „oxidativer Stress“ oder „Reaktive Sauerstoffspezies“ fallen oft, wenn über die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder Krebs gesprochen wird. Oft wird dabei postuliert, dass mit der Aufnahme von Antioxidantien freie Radikale im Körper abgefangen, oxidativer Stress bekämpft und dem Ausbruch der genannten Krankheiten entgegengewirkt werden kann.

Zunächst einmal steht fest, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS = reactive oxygen species) und reaktive Stickstoffspezies (RNS = reactive nitrogen species) freie Radikale sind, die in zahlreichen biochemischen Reaktionen eine wichtige Rolle spielen. Sie entstehen z. B. als Nebenprodukte der Atmungskette. Dabei sind die bedeutendsten unter ihnen Hydroxyl- (HO^*) und Peroxylradikale (ROO^*), Wasserstoffperoxid und Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) sowie Stickstoffmonoxid (NO^*) und Peroxynitrit (ONOO^-) (Sies, 1991; Sies, 1997; Valko et al., 2006; Ott et al., 2007; Ryter et al., 2007). Als sehr aggressive und reaktive Verbindungen spielen sie eine wichtige Rolle bei verschiedenen Abwehrreaktionen des Immunsystems. Sie sind von großer Bedeutung bei der intrazellulären Abtötung von Mikroorganismen durch phagozytierende Zellen des Immunsystems sowie bei der Regulation des Gefäßtonus (Kelm, 2003; Valko et al., 2006; Halliwell und Gutteridge, 2007). Allerdings ist eine ausgeglichene Bilanz zwischen Prooxidantien und der antioxidativen Abwehr sehr wichtig, denn wenn freie Radikale überhand nehmen, steht der Körper unter oxidativem Stress. Unter diesen Bedingungen kann die hohe Konzentration an freien Radikalen zu Schädigungen wichtiger Biomoleküle wie Lipide, Proteine und DNA und längerfristig auch zu degenerativen Erkrankungen führen (Ames et al., 1993; Halliwell, 2006; Valko et al., 2006; Ryter et al., 2007).

Die Begünstigung der Entstehung des oxidativen Stresses, durch die Immunabwehr des Körpers, durch den Genuss von Tabak, Alkohol oder als Reaktion auf körperlichen Stress, ist heute unbestritten (Wu und Cederbaum, 2003; Agarwal, 2005), genauso wie die Beteiligung des oxidativen Stresses auf einige Initialschritte der Atherogenese und die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen durch die Oxidation des Low Density Lipoproteins (LDL) sowie die Anlagerung von sog. Schaumzellen an den Gefäßwänden (siehe Abb. 2.12) (Berliner und Heinecke, 1996; Diaz et al., 1997; Steinberg, 1997; Heinecke, 1998; Cobbald et al., 2002).

Um die Konzentration an Prooxidantien im Gleichgewicht zu halten, besitzt der Körper vielfältige Schutzfunktionen, die der Abwehr freier Radikale dienen und der Entstehung des oxidativen Stresses entgegenwirken. Neben vielen enzymatischen Abwehrmechanismen sowie der körpereigenen Abwehr durch antioxidative Verbindungen spielen auch über die Nahrung aufgenommene Vitamine wie Vitamin C und antioxidativ wirksame Nahrungsbestandteile eine wichtige Rolle. Zu diesen Substanzen gehören auch die phenolischen sekundären Pflanzeninhaltsstoffe. So können Anthocyan- und polyphenolreiche Extrakte beispielsweise oxidativen Schäden an Lipiden, Proteinen und DNA entgegenwirken (Spormann et al., 2008). Die antioxidative Wirkung von Flavonoiden lässt sich durch ihre Struktur erklären. Phenolische Hydroxylgruppen können freie Radikale abfangen und anhand von Metallbindungsdomänen können redoxaktive Übergangsmetalle durch Bildung von Chelatkomplexen gebunden werden (Hider et al., 2001; Perron und Brumaghim, 2009).

So kann zum Beispiel Einfluss auf die durch Eisensalze katalysierte Fenton-Reaktion genommen werden und der Bildung des aggressiven Hydroxylradikals aus Wasserstoffperoxid sowie den daraus resultierenden möglichen DNA-Schäden entgegengewirkt werden (siehe Abb. 2.13).

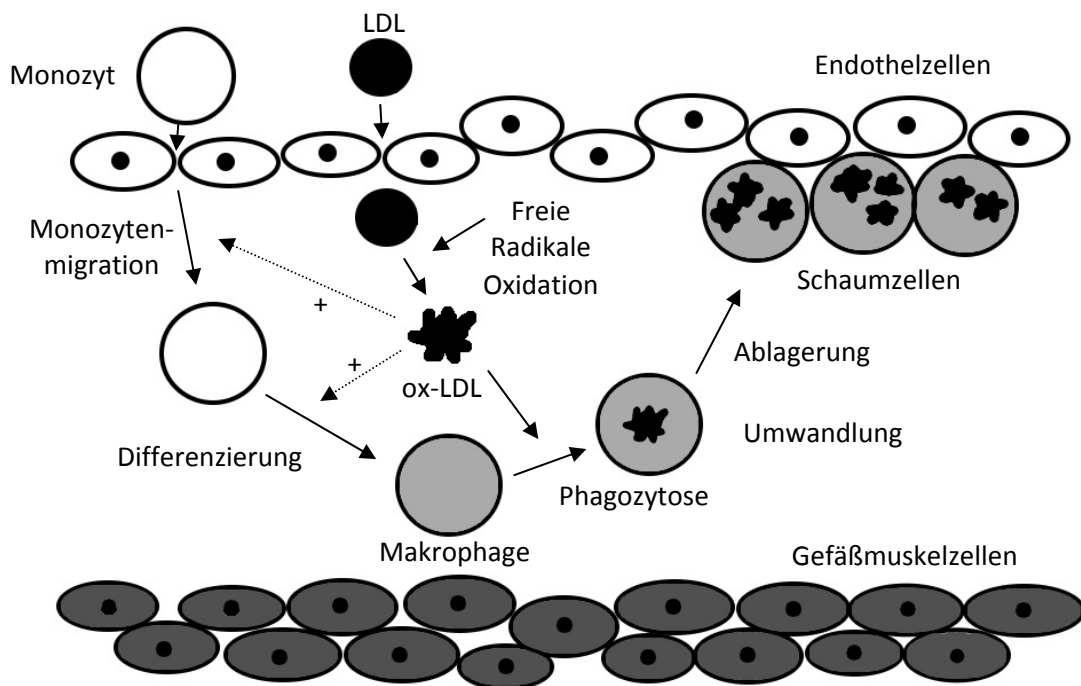


Abb. 2.12: Rolle der Oxidation des Low Density Lipoproteins (LDL) im frühen Stadium der Atherogenese in Anlehnung an Berliner und Heinecke (1996).

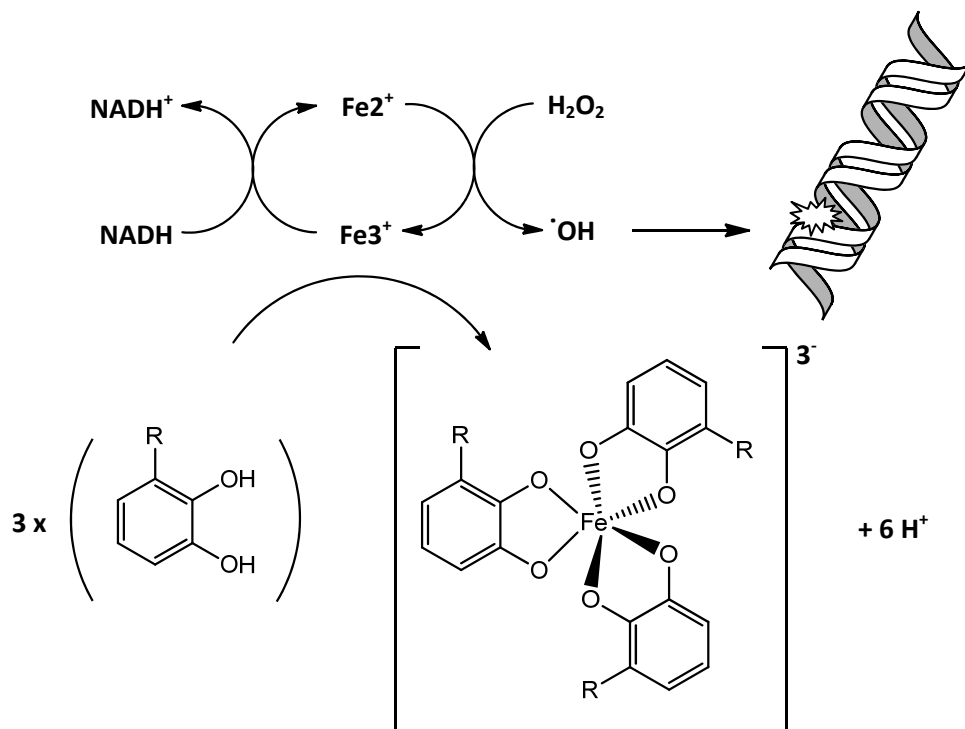
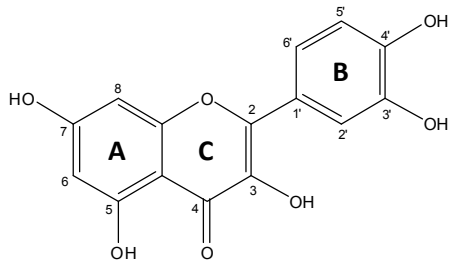


Abb. 2.13: Einfluss von Polyphenolen mit Metallbindungsdomänen auf die Fenton-Reaktion (Perron und Brumaghim, 2009).

Es gibt zahlreiche Publikationen, in denen die für die antioxidative Aktivität verantwortlichen Strukturmerkmale untersucht wurden (Bors et al., 1990; Rice-Evans et al., 1996; Cao et al., 1997; Sugihara et al., 1999; Burda und Oleszek, 2001). Einige der wichtigsten Funktionen sind im Folgenden aufgeführt und werden anhand des Quercetin-Moleküls gezeigt (siehe Abb. 2.14).



- zwei orthoständige Hydroxylgruppen am B-Ring
 - eine 2,3-Doppelbindung + 4-Carbonylgruppe am C-Ring
 - Hydroxylgruppe an Position 3 + 2,3-Doppelbindung am C-Ring
- sowie die Metallbindungsdomänen nach Hider et al. (2001):**
- 3,4-Dihydroxylgruppe am B-Ring
 - 3-Hydroxylgruppe und 4-Carbonylgruppe am C-Ring
 - 5-Hydroxylgruppe am A- und 4-Carbonylgruppe am C-Ring

Abb. 2.14: Struktur von Quercetin sowie die wichtigsten für die antioxidative Aktivität verantwortlichen funktionellen Gruppen.

Das Quercetin-Molekül zeigt alle aufgeführten Strukturmerkmale. Daraus erklärt sich die hohe antioxidative Aktivität (TEAC = 4,72 mM Trolox) dieser Verbindung (Rice-Evans et al., 1996). Die antioxidative Aktivität kann anhand verschiedenster Methoden bestimmt werden. Oft führen die unterschiedlichen Bestimmungsmethoden, bedingt durch ihre unterschiedlichen Reaktionsmechanismen, zu abweichenden Ergebnissen. Deshalb sollten zur Beurteilung, wie von Schlesier et al. (2002) gefordert, mindestens zwei Testsysteme zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität herangezogen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb mit der photometrischen Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu (Kapitel 2.3.1) und dem TEAC-Assay (Kapitel 2.3.2) zwei unterschiedliche, aber sehr weit verbreitete Testverfahren, zur Beurteilung der antioxidativen Wirksamkeit herangezogen.

Populärwissenschaftlich und durch die Anpreisungen der Hersteller von Nahrungsergänzungsmitteln wird eine hohe antioxidative Aktivität oft mit einer hohen Wirksamkeit gegen die bereits genannten Erkrankungen gleichgesetzt. Hierbei ist aber zu bedenken, dass die zugeführten Verbindungen im Körper oft ganz andere Reaktionen eingehen als in den genannten Testsystemen. So ist zum Beispiel die im Rahmen des TEAC-Assays stattfindende Reaktion des ABTS^{•+}-Radikals mit Polyphenolen *in vivo* überhaupt nicht gegeben. Auch sagen die Tests nichts über die Bioverfügbarkeit der einzelnen Verbindungen aus. Im Falle von Anthocyanen, die im TEAC-Assay eine sehr hohe antioxidative Aktivität zeigen, liegt die Bioverfügbarkeit im menschlichen und tierischen Organismus bei maximal 1,8% (Ichihyanagi et al., 2006; Talavéra et al., 2006; McGhie und Walton, 2007). Es zeigt sich also in vielen Fällen eine enorme Diskrepanz zwischen der antioxidativen Aktivität, die im *in vitro*-Test ermittelt wird, und derjenigen, die später *in vivo* tatsächlich wirksam wird. Trotzdem ist das Angebot an diversen Nahrungsergänzungsmitteln und Produkten, die mit einem hohen antioxidativen Potential werben, seit einigen Jahren ständig im Wachstum und es gibt eine unüberschaubare Fülle solcher Produkte. Diese Entwicklung ist aber nicht nur positiv zu sehen. So kann ein Überschuss an zugeführten antioxidativ wirksamen Verbindungen durchaus ein Risiko für die Gesundheit darstellen. Denn durch die vielfältigen Reaktionen im menschlichen Körper und die resultierenden Reaktionsprodukte dieser Verbindungen lässt sich ein gesundheitliches Risiko nicht ausschließen. So führte beispielsweise die Supplementation mit α -Tocopherol und β -Carotin im Rahmen einer Studie, bedingt durch die Reaktionsprodukte von β -Carotin aus der Reaktion mit freien Radikalen, bei Rauchern nicht wie erwartet zu einer Verringerung, sondern zu einem Anstieg der Krebsrate (Virtamo

et al., 2003). Auch viele Krebspatienten unterliegen dem Irrglauben, dass sie mit der Zuführung antioxidativ wirksamer Nahrungsergänzungsmittel etwas Positives für ihre Gesundheit tun. Aufgrund der gezeigten Wirkungszusammenhänge kann jedoch bei bereits Erkrankten genau das Gegenteil der Fall sein, denn durch die Unterdrückung freier Radikale können auch die körpereigenen Abwehrmechanismen gegen die Krebszellen geschwächt werden (Lawenda et al., 2008).

Zusammengefasst sind ein gesunder Lebensstil und eine ausgewogene Ernährung der Supplementation mit Nahrungsergänzungsmitteln unbedingt vorzuziehen. Es sind noch viele Fragen zur Bioverfügbarkeit, Verstoffwechselung und zu den Wirkmechanismen der Polyphenole offen. Zur Klärung bedarf es allerdings auch hier effizienter Methoden zur Isolierung und Fraktionierung der phenolischen Inhaltsstoffe.

2.3 Grundlagen angewandeter Methoden

2.3.1 Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes (Folin-Ciocalteu)

Bei der Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu wird die reduzierende Kapazität einer Probe erfasst (Huang et al., 2005). Es handelt sich analog dem TEAC-Assay um eine Methode zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität und nicht wie aufgrund der Namensgebung oft fälschlich angenommen, um eine selektive Methode zur ausschließlichen Erfassung phenolischer Verbindungen. Die Methode spricht auch auf antioxidativ wirksame Vitamine wie Vitamin C und Vitamin E an, weshalb ein zu hoher Gesamtpolyphenolgehalt vorgetäuscht werden kann. Auch mit Proteinen reagiert der Test aufgrund der proteinogenen Aminosäure Tyrosin, die eine phenolische OH-Gruppe besitzt, positiv (Folin und Ciocalteu, 1927). Im Jahr 1965 wurde die von Folin und Ciocalteu entwickelte Methode zur Proteinbestimmung weiterentwickelt und zur Bestimmung von Polyphenolen in Wein genutzt (Singleton und Rossi, 1965). Heute wird sie gerne verwendet, um die Gesamtheit phenolischer Verbindungen in einer Probe zu ermitteln, weil die Reaktivität des Tests nahezu proportional zur Anzahl freier phenolischer Hydroxylgruppen ansteigt.

Die Folin-Ciocalteu Methode beruht darauf, dass aus Wolframat, Molybdat und Phosphorsäure gebildete Komplexe im alkalischen Milieu (Folin-Ciocalteu-Reagenz) zu blauen Farbpigmenten reduziert werden. Diese Farbpigmente lassen sich anschließend photometrisch bei 765 nm bestimmen. Die Farbintensität der Lösung ist proportional zum Gehalt an reduzierenden bzw. oxidierbaren Verbindungen. Das Ergebnis wird standardmäßig in Form von Gallussäure-Äquivalenten durch eine Kalibrierreihe mit Gallussäure angegeben.

2.3.2 Bestimmung der antioxidativen Aktivität („TEAC-Assay“)

Die Bestimmung der antioxidativen Aktivität in einer Probe mittels des TEAC-Assays beruht ursprünglich auf der Methode nach Miller et al. (1993). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch eine abgewandelte Form nach Re et al. (1999) eingesetzt. Grundlage der Methode ist die Reaktion von 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure; ABTS) mit Kaliumperoxodisulfat zu ABTS^{•+}-Radikalen. Die Reaktionslösung ist aufgrund der ABTS^{•+}-Radikale grünlich gefärbt. Durch Hinzufügen einer antioxidantienhaltigen Probe wird die Lösung aufgrund der Reduktion der Radikale wieder entfärbt. Der Grad der Entfärbung wird bei 734 nm, dem Absorptionsmaximum der ABTS^{•+}-Radikale, photometrisch bestimmt und ist proportional zur Aktivität der Antioxidantien in der Probenlösung.

Als Bezugssubstanz wird eine Kalibriergerade mit dem antioxidativ wirksamen Vitamin E-Derivat 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox) erstellt. Die ermittelten antioxidativen Aktivitäten werden in Bezug auf die Aktivität einer 1 mM Trolox-Lösung angegeben (TEAC = Trolox equivalent antioxidant capacity).

2.3.3 Gegenstromverteilungschromatographie

Die Gegenstromverteilungschromatographie (engl. Countercurrent Chromatography, CCC) ist eine Trenntechnik, die sich besonders für die Auftrennung und Isolierung von Naturstoffen oder synthetisch hergestellten Verbindungen aus komplexen Mischungen bewährt hat. Die Geschichte dieser Trenntechnik begann in den 60er Jahren mit der Entwicklung der Coil Planet Centrifuge zur Isolierung von Lymphozyten (Ito et al., 1966). Es folgten hydrostatische Systeme wie die Centrifugal Partition Chromatographie (CPC) und die Droplet CCC, bevor in den achtziger Jahren hydrodynamische Systeme wie die High-Speed Countercurrent Chromatographie (HSCCC) entwickelt wurden. Bei der CCC wird vollständig auf Trägermaterialien verzichtet, denn es wird ausschließlich mit Flüssigkeiten gearbeitet. Das hat den Vorteil, dass es neben der hohen Probenbelastbarkeit nicht zu irreversiblen Adsorptionen oder oberflächenkatalysierten Reaktionen kommen kann. Es handelt sich somit um eine sehr schonende, weitestgehend verlustfreie Trennmethode (Ito, 2005). Nicht zuletzt ist die Methode aus den genannten Gründen auch relativ kostengünstig, denn es müssen keine teuren Säulenmaterialien erworben werden.

Die Trennung beruht auf dem Nernst'schen Verteilungskoeffizienten der zu trennenden Verbindungen in zwei nicht miteinander mischbaren Lösungsmittelphasen. Das Prinzip ist vergleichbar mit vielen aneinander gereihten Extraktionsschritten in Schütteltrichtern. Der Verteilungskoeffizient drückt das Verhältnis der Konzentration der Verbindung in der stationären zur Konzentration der Verbindung in der mobilen Phase des Fließmittelsystems aus (Conway, 1991).

$$K = \frac{c_s}{c_m}$$

(c_s = Konzentration des Analyten in der stationären Phase; c_m = Konzentration des Analyten in der mobilen Phase)

Um die Analyten erfolgreich per CCC auftrennen zu können, sollte der Verteilungskoeffizient einen Wert zwischen 0,5 und 1,5 aufweisen. Ist der Verteilungskoeffizient kleiner, kommt es zu einer raschen Elution mit ungenügender Auftrennung der Analyten. Je größer der Verteilungskoeffizient wird, desto länger dauert es, bis die Verbindung eluiert. Dabei kommt es zur Verbreiterung der Peaks und zu einer Abnahme der Trennschärfe. Bei einem zu großen Verteilungskoeffizienten verbleibt die Verbindung aufgrund ihrer guten Löslichkeit in der stationären Phase auf dem Coil. Während einer gegenstromverteilungschromatographischen Trennung wird die mobile Phase durch die stationäre Phase hindurch gepumpt, während die stationäre Phase im Idealfall möglichst vollständig im Trennsystem verbleibt. Die Retention der stationären Phase wird entweder durch das hydrostatische Prinzip, bei dem statische Kräfte den Verbleib im Trennsystem bewirken, oder durch das hydrodynamische Prinzip gewährleistet.

2.3.3.1 High-Speed Countercurrent Chromatographie (HSCCC)

Die High-Speed Countercurrent Chromatographie (HSCCC) ist ein hydrodynamisches System und beruht auf zwei grundlegenden Prinzipien. Es handelt es sich um das Prinzip der Archimedischen Schraube und das Prinzip der Phasenmischung und Phasentrennung. Beide Prinzipien sind dafür verantwortlich, dass sich während der Trennung ein unilaterales hydrodynamisches Fließgleichgewicht ausbildet, welches zu einer erfolgreichen verteilungschromatographischen Trennung genutzt werden kann (Ito, 1992).

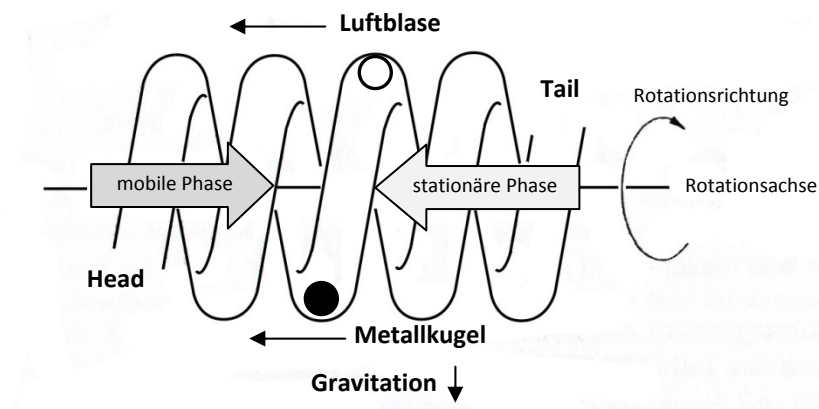


Abb. 2.15: Prinzip der Archimedischen Schraube nach Sutherland (1987).

Unter dem Prinzip der Archimedischen Schraube versteht man das Phänomen, dass Flüssigkeiten in einem helical gewundenen Schlauch beim Drehen des Schlauches um die helicale Achse des Systems durch die dabei auftretenden vertikalen Kräfte in eine Richtung transportiert werden. Dabei wird das Schlauchende, das in die Rotationsrichtung zeigt, als „Tail“, das entgegen der Rotationsrichtung zeigende Schlauchende als „Head“, und der gewundene Schlauch als Coil bezeichnet (siehe Abb. 2.15). Die Bewegung der Flüssigkeit findet wie die Bewegung der Metallkugel und der Luftblase stets in „Head“-Richtung statt. Da sich bei HSCCC-Trennungen immer zwei verschiedene Lösungsmittelphasen auf dem Coil befinden, erfahren diese unterschiedliche Beschleunigung. In einem geschlossenen System würde eine bilaterale Verteilung der Phasen stattfinden. Auf dem Coil führen diese Beschleunigungen dazu, dass eine der Phasen zum „Head“, die andere Phase zum „Tail“ befördert wird. Dieses Verhalten wird ausgenutzt, um die stationäre Phase auf dem Coil zu halten. Wird bei einer HSCCC-Trennung die mobile Phase vom „Head“ zum „Tail“ gepumpt, so dient die leichtere der Lösungsmittelphasen als stationäre Phase, da sie durch die Rotation in Richtung „Head“, also entgegen der mobilen Phase befördert wird. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, die schwerere der beiden Lösungsmittelphasen als stationäre Phase zu nutzen. Dazu muss die Richtung der mobilen Phase von „Tail“ zu „Head“ verändert werden. Durch diese Maßnahme wird eine Elutionsumkehr der Analyten durch Umkehr des Bruches für den Verteilungskoeffizienten erreicht. So obliegt es dem Anwender, ob mit dem Durchbruch der mobilen Phase zunächst die polareren oder die unpolaren Analyten eluieren sollen.

Abb. 2.16 zeigt den typischen Aufbau einer CCC-Anlage. Mittels einer HPLC-Pumpe wird das für die Trennung eingesetzte Lösungsmittel durch eine Injektionsschleife zum Coilsystem befördert. Die aus dem Coil eluierenden Verbindungen werden mittels eines Detektors erfasst und durch einen Fraktionssammler aufgefangen. In der Abbildung ist eine sog. Single Coil Anlage zu sehen.

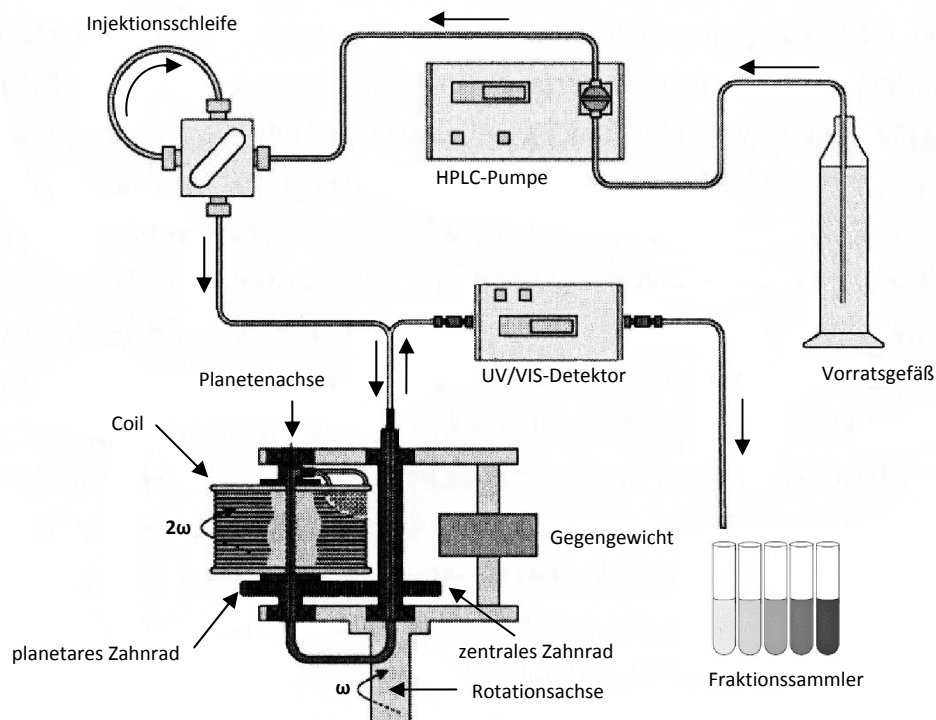


Abb. 2.16: Aufbau einer HSCCC-Anlage nach Sutherland (1987).

Bei der in dieser Arbeit eingesetzten HSCCC Anlage wurde eine Triple-Coil-Anlage verwendet. Bei Triple-Coil-Anlagen sind drei Coils, die aus spiralförmig um eine Achse gewickelten Teflonschläuchen bestehen, in Reihe geschaltet. Jeder Coil dreht sich während der Trennung um seine eigene, sowie mit gleicher Richtung auf einer planetaren Umlaufbahn um die Zentralachse. Die Abb. 2.17 zeigt die aus der Addition der Fliehkräfte dieser zwei Bewegungen entstehenden heterogenen Kraftfelder, die jeder Punkt des Schlauches auf seiner Umlaufbahn durchläuft.

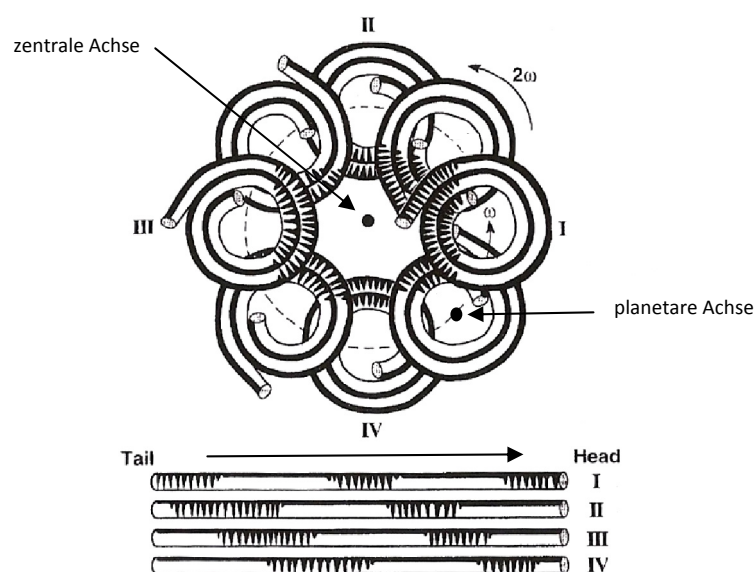


Abb. 2.17: Prinzip der Phasenmischung und Phasentrennung der HSCCC (Ito und Conway, 1986).

Dies bewirkt ein alternierendes Mischen und Entmischen der Flüssigkeiten, wobei das Mischen der Phasen in dem der Zentralachse zugewandten Bereich („mixing zones“), das Entmischen der Phasen im äußeren der Zentralachse abgewandten Bereich („settling zone“) stattfindet (Ito, 2005). Dabei wandern die Mischungszonen, hervorgerufen durch die Rotation der Coils, vom Tail- zum Head-Ende. Bei einer Rotation von 800 U/min finden ca. 50000 Mischungsvorgänge pro Stunde statt (Ito und Conway, 1986). Durch dieses ständige Mischen und Entmischen, sowie die vielfachen Gleichgewichtseinstellungen der zu trennenden Analyten in den aneinander vorbeifließenden Flüssigkeitsphasen, wird eine Trennung der Analyten aufgrund ihrer verschiedenen Nernst'schen Verteilungskoeffizienten erreicht.

2.3.3.2 Low-speed rotary countercurrent chromatography (LSRCCC)

Auch die Low-Speed Rotary Countercurrent Chromatographie (LSRCCC) ist ein hydrodynamisches System, allerdings in einem viel langsamer rotierenden helicalen Coil. Zwar ist das Prinzip der unilateralen hydrodynamischen Verteilung zweier Lösungsmittelphasen in einem langsam rotierenden Coil schon länger bekannt (Ito, 1992), aber erst seit dem steigenden Bedarf an präparativen Verfahren zur Fraktionierung großer Probenmengen wurde es seit 2000 mit der Entwicklung eines LSRCCC Prototypen effektiv zur Fraktionierung und Isolierung eingesetzt (Du et al., 2000). Dazu beigetragen hat die Verfügbarkeit spezieller Teflon-Schläuche, sog. „convoluted tubings“, die zu einer Verbesserung des Durchmischens der Phasen, zu höherer Retention und somit zu verbesserten Trennleistungen führten (Du et al., 2000; Du und Ito, 2003). Aufgrund des viel größeren Coilvolumens ermöglicht die LSRCCC nicht nur viel größere Probenaufgabemengen gegenüber der HSCCC, sondern auch eine Anreicherung von Minorkomponenten aus Naturstoffextrakten, deren Isolierung erst dadurch möglich gemacht wurde. Mittels des in dieser Arbeit verwendeten LSRCCC-Prototypen mit einem Coilvolumen von 5,5 L konnten problemlos 30 g eines Brombeerextraktes getrennt und 8,6 g Cyanidin-3-glucosid isoliert werden (Winterhalter, 2007). Mit einem noch größeren LSRCCC Prototypen und einem Coilvolumen von 40 L konnten in einer 20 Std. andauernden Trennung 63,5 g Salicin aus 500 g Weidenrindenextrakt isoliert werden (Du et al., 2005).

Abb. 2.18 zeigt den Querschnitt eines LSRCCC Prototypen, wie er im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde. Der Coil der LSRCCC besteht aus einem Teflonschlauch mit einem großen Innendurchmesser von 8,5 mm, der in vier Lagen helical um einen Halter gewickelt ist. Die Form des gewundenen Schlauches (convoluted tubing) wird ebenfalls in der Abbildung gezeigt. Der Coil ist horizontal ausgerichtet und dreht sich während der Trennung langsam mit einer Geschwindigkeit von 50 bis 100 U/min um seine Zentralachse. Dadurch kommt es zu einem hydrodynamischen Fließverhalten der schweren Phase zum Head-Ende des Coils, genau entgegengesetzt zur Bewegung der schweren Phase bei der HSCCC (Ito und Conway, 1986). Bei sehr langsamer Rotation bis 20 U/min geht man von einer Bewegung beider Phasen zum Head-Ende aus, die auf das Prinzip der Archimedischen Schraube zurückzuführen ist und aufgrund der tangentialen Krafteinwirkung der Gravitation stattfindet. Bei Zunahme der Rotation nehmen jedoch die radialen Kräfte (Fliehkräfte) zu. Es entsteht, wenn auch in abgeschwächter Form, wie bei der HSCCC ein heterogenes Kraftfeld durch Addition beider Kraftvektoren. Dieses Kraftfeld ist abhängig vom helicalen Durchmesser und der Rotationsgeschwindigkeit.

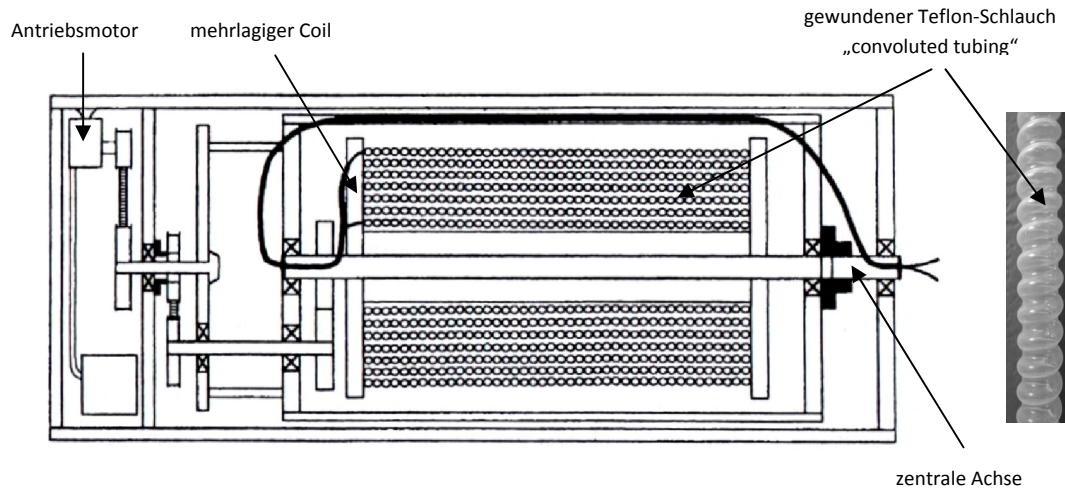


Abb. 2.18: Querschnitt eines LSRCCC-Prototypen mit horizontal angeordnetem in mehreren Schichten helical gewickelten Coil (Du und Ito, 2003) (links) aus „convoluted tubing“, einem Teflonschlauch mit helical eingearbeiteter Wandungsform (rechts).

Während die vertikale Kraft unverändert bleibt, erfolgt bei Umdrehungsgeschwindigkeiten von 50 bis 100 U/min eine asymmetrische Verteilung der radialen Kräfte, so dass die Archimedischen Kräfte nicht mehr gleichmäßig im Coil wirken (siehe Abb. 2.19). Das Ergebnis ist die schon angesprochene Bewegungsrichtung der schweren Phase zum Head-Ende, so dass abhängig vom helicalen Durchmesser und dem Fließmittelsystem ausschließlich Umdrehungsgeschwindigkeiten von 50 bis 100 U/min für die Trennungen mittels LSRCCC eingesetzt werden können.

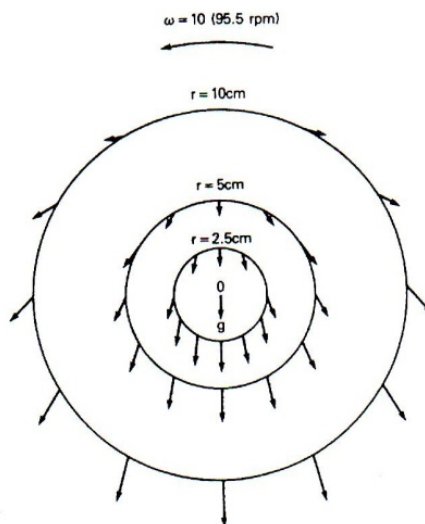


Abb. 2.19: Heterogenes Kraftfeld der LSRCCC (Köhler, 2006).

Je nach Rotationsrichtung des Coils lässt sich bei der LSRCCC entweder Head to Tail (H) oder Tail to Head (T) trennen. Dabei kann entweder die leichte (U = upper phase) oder die schwere (L = lower phase) als mobile Phase verwendet werden. Diese kann mittels der Pumpe entweder vom Inneren des Coils nach außen (I), oder von außen nach innen (O) befördert werden. Dadurch ergeben sich theoretisch 8 verschiedene Elutionsmodi. Allerdings eignen sich nur vier für effektive LSRCCC-Trennungen. Das sind die Modi L-I-T und L-I-H, bei welchen die schwere Phase des Fließmittelsystems

entweder im Tail to Head oder im Head to Tail Modus vom Inneren des Coils nach außen gepumpt wird. Außerdem sind die Modi U-O-T und U-O-H, bei denen die leichte Phase von Head to Tail oder von Tail to Head von außen zum Inneren des Coils transportiert wird geeignet. Die vier übrigen Elutionsmodi L-O-H, L-O-T, U-I-H und U-I-T sind aufgrund der schlechten Retention an stationärer Phase und der damit verbundenen schlechten Trennleistungen nicht sinnvoll einsetzbar.

2.3.4 Membranchromatographie zur Isolierung von Anthocyanen

Durch die ständige Weiterentwicklung und die steigenden Anforderungen an pharmazeutische und biotechnologische Prozesse ist ein zusätzlicher Bedarf an leistungsstarken Trenntechniken entstanden, welche die traditionellen Verfahren ergänzen. Im industriellen Prozess werden hohe dynamische Bindungskapazitäten bei möglichst hohen Produktionsgeschwindigkeiten immer wichtiger. Zwar bieten die etablierten chromatographischen Aufreinigungstechniken wie die Ionenaustauschchromatographie (IEX), die Affinitätschromatographie (AC) und die Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) einige Vorteile, es gibt aber immer noch bekannte Schwachstellen, die bisher mehr oder weniger billigend in Kauf genommen wurden. Wirtschaftliche Faktoren sowie die stark gestiegenen Zellkulturvolumina von bis zu 20000 l und Proteinkonzentrationen von bis zu 10g/l erzwingen zunehmend alternative Vorgehensweisen. Die Ionenaustauschchromatographie erfordert z. B. die sorgfältige Einstellung des Feedstocks hinsichtlich pH-Wert und Leitfähigkeit und oftmals Verdünnungen um das 3 bis 6-fache. Im Labormaßstab ist dies sicherlich realisierbar, für den großtechnischen Prozess bedeuten allerdings allein die dafür erforderlichen Puffermengen große Probleme hinsichtlich Lagerung und Kosten.

Die Membranchromatographie stellt ein alternatives Verfahren zur Aufreinigung, Isolierung und Rückgewinnung von Proteinen und Enzymen dar. Statt einer gefüllten Säule mit chromatographischer Matrix wird eine in einem Gehäuse installierte ein- oder mehrlagige Membran verwendet. Durch diese Membran wird die mobile Phase bei niedrigen Drücken von bis zu 4 bar und vielfach höheren Flussraten als bei herkömmlichen säulenchromatographischen Methoden hindurch gepumpt. Für die in dieser Arbeit durchgeführten membranchromatographischen Trennungen wurden Membranadsorbereinheiten mit der Bezeichnung Sartobind® S der Firma Sartorius AG aus Göttingen verwendet. Diese Adsorber bestehen aus Hydrosart®, einer Cellulose, die durch sogenannte X-Linker gegen Säuren und Laugen stabilisiert ist. Die Membran ist netz- bzw. schwammartig strukturiert, wobei der Durchmesser der Poren zwischen 0,45 und 3µm liegt (siehe Abb. 2.20). Je nach Adsorbentyp wird die Membranoberfläche an den freiliegenden OH-Gruppen modifiziert. Im Falle des hier verwendeten S-Typen handelt es sich bei der Modifizierung um negativ geladene Sulfonsäuregruppen und somit um einen starken Kationenaustauscher. Dieser Membran-Typ wurde bereits erfolgreich zur Isolierung und Aufreinigung von Proteinen eingesetzt (Plate et al., 2006).

Während herkömmliche chromatographische Gel-Matrices relativ lange Trennzeiten erfordern (diffusionslimitierte Gele), erfolgt bei der Membranchromatographie der Transport der zu trennenden Moleküle rein konvektiv mit der Strömung. Das äußert sich im Falle der Membranchromatographie in einer viel geringeren Trennzeit, die höchstens durch die zu vernachlässigende Filmdiffusion der Probenmoleküle an der adsorbierenden Membranoberfläche limitiert wird. Dagegen müssen bei herkömmlichen chromatographischen Gel-Matrices und anderen diffusionslimitierten Matrices die zu trennenden Moleküle zunächst durch Diffusion in die Partikel der stationären Phase eindringen, um das ihnen zur Verfügung stehende Diffusionsvolumina vollständig auszunutzen.

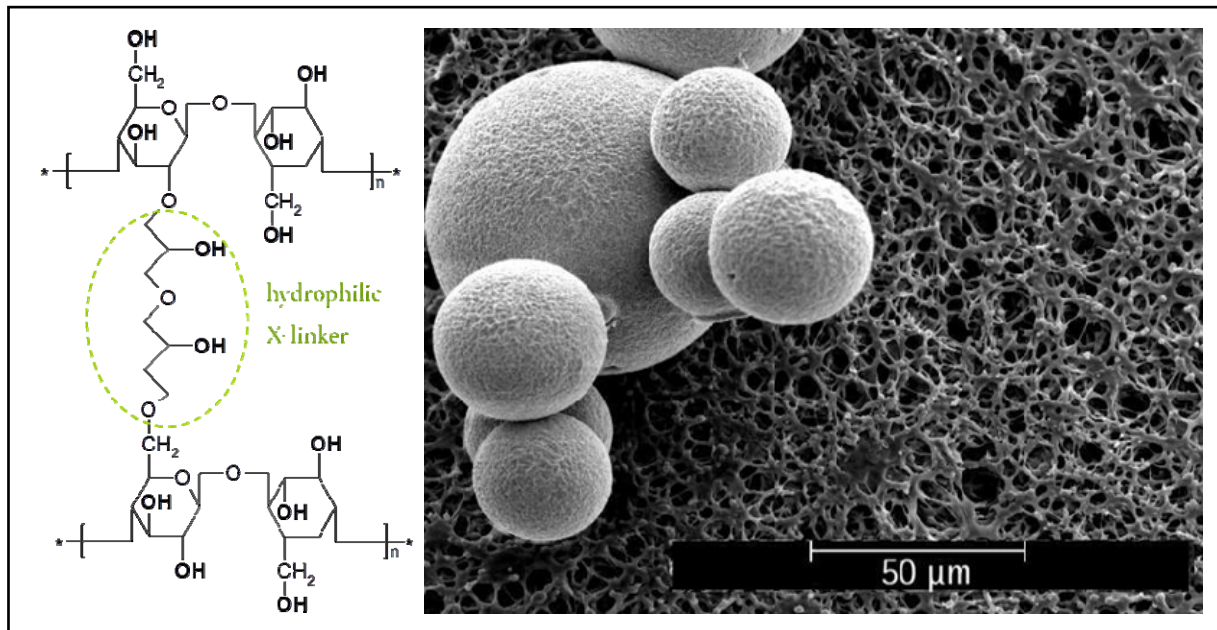


Abb. 2.20: Chemische Struktur von Hydrosart®, einer säure- und laugenstabilen Cellulose. Rechts die Struktur der daraus hergestellten netzartigen Membran mit einem Porendurchmesser von 0,45 bis 3 µm im Vergleich mit Partikeln herkömmlicher chromatographischer Gel-Matrices (Bildquelle: Sartorius AG, Göttingen, Deutschland).

Im Falle von Gelen, wie z. B. Sephadex LH-20 (Henke, 1994), ist das Diffusionsvolumen abhängig von der Molekülgröße und kann somit nur bei ausreichender Zeit (d. h. geringeren Flussraten) vollständig zur optimalen Trennung genutzt werden (je kleiner das Molekül, desto größer das Diffusionsvolumen und damit der Aufenthalt in der stationären Phase). Bei der Membranchromatographie sind dagegen deutlich höhere Flussraten und somit viel kürzere Trennzeiten möglich (Ohlrogge und Ebert, 2006). Während aufgrund der starken Diffusionslimitierung die dynamische Bindungskapazität von konventionellen Gelen mit steigenden Flussraten abnimmt, bleibt sie während der Membranchromatographie bis zu Flussraten von 40 x Bettvolumen/min und auch darüber hinaus nahezu konstant (siehe Abb. 2.21), wie sich bei der Aufreinigung und Isolation von Proteinen wie z. B. Rinderserumalbumin gezeigt hat (Fischer-Frühholz, 2004).

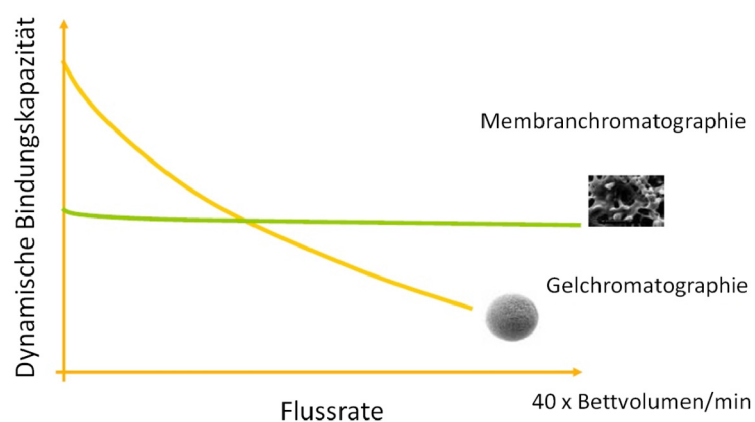


Abb. 2.21: Dynamische Bindungskapazität in Abhängigkeit von der Flussrate bei Membran- und Gelchromatographie von Proteinen (Bildquelle: Sartorius AG, Göttingen, Deutschland).

Die große dynamische Bindungskapazität ermöglicht somit schnelle Zyklen bei relativ geringem Bettvolumen. Würde sich dieses Prinzip auch auf phenolische Inhaltsstoffe wie Anthocyane übertragen lassen, so wären die minutenschnellen Produktzyklen nicht nur für den industriellen Prozess von entscheidendem Vorteil, sondern auch im Hinblick auf eine schnelle Verarbeitung der sehr empfindlichen Inhaltsstoffe. Bisher erfolgt die Anreicherung von Polyphenolen und die Herstellung von polyphenolreichen Naturstoffextrakten meistens in großen Säulen mittels diverser Austauscherharze wie z. B. Amberlite® XAD-7 (Degenhardt et al., 2000; Silva et al., 2007). Statt bis zur vollständigen Beladung große Probenmengen bei geringen Flussraten aufzugeben, könnten im Rahmen einer membranchromatographischen Methode mit mehreren minutenschnellen Beladungs- und Entladungszyklen kurze Verarbeitungs- bzw. Standzeiten realisiert, das Produkt geschont und ein teilweiser Abbau der empfindlichen Zielmoleküle weitestgehend verhindert werden.

Angestoßen durch die Vorteile dieser Methode entstand die Idee einer Isolierung von Anthocyanen mittels Membranchromatographie. Wenn die bei einem bestimmten pH-Wert in gepufferter Lösung vorliegenden positiv geladenen Proteine von der Membranoberfläche selektiv adsorbiert werden, dann sollte sich dieses Prinzip auch auf die Anthocyane übertragen lassen. Bekanntermaßen liegen die Anthocyane im Sauren als positiv geladene Flavyliumkationen vor (vergl. Kapitel 2.2.2.2). Nach dem Ansäuern einer Extraktlösung und der Überführung der Anthocyane in Flavyliumkationen sollte auch hier eine Adsorption der Kationen an der durch die Sulfonsäuregruppen negativ geladenen Membranoberfläche erfolgen (siehe Abb. 2.22).

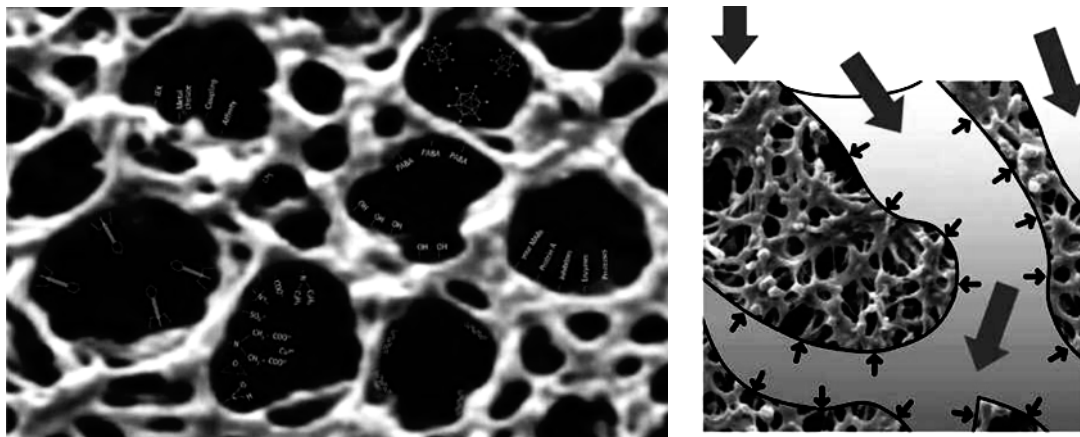


Abb. 2.22: Mikroporöse netzartige Struktur der Sartobind Membran Adsorber bei Porengrößen von 0,45 bis 3 µm (links) und konvektiver Fluss durch den Membranadsorber, wobei die Zielmoleküle an der modifizierten Oberfläche adsorbiert werden (rechts) (Bildquelle: Sartorius AG, Göttingen, Deutschland).

Nicht positiv geladene Verbindungen würden dagegen die netzartige Struktur der Membran passieren. Auf diese Weise wäre eine Trennung von Anthocyanen und den restlichen phenolischen Extraktbestandteilen möglich. Diese Überlegungen sowie die eingangs beschriebenen Vorteile der Membranchromatographie gegenüber etablierten Methoden waren ausschlaggebend für die in Kapitel 3.5 gezeigte Entwicklung einer membranchromatographischen Methode zur Isolierung von Anthocyanen bzw. zur Fraktionierung von anthocyanhaltigen Extrakten mittels der Sartobind S Membran Adsorber.

Obwohl es sich beim Trennmechanismus eigentlich um einen Ionenaustausch handelt, wird heute zur besseren Unterscheidung von den herkömmlichen Ionenaustauschern, wie sie z. B. für die Wasserentsalzung verwendet werden, von Membranchromatographie gesprochen. Das beruht vor allem auf der Tatsache, dass die ersten auf Nylon 6,6 Basis entwickelten Membranadsorber mit reaktiven Triazin-Farbstoffen wie z. B. Cibacron Blue F3GA als Liganden ausgestattet waren (Gianazza und Arnaud, 1982; Ghosh und Konishi, 2007; Nie und Zhu, 2007). Der Adsorptionsmechanismus dieser Liganden mit z. B. Dehydrogenasen aus Mikroorganismen verläuft auch über nichtionische Wechselwirkungen. Deshalb wurde hier von Chromatographie und eben nicht von Ionenaustausch gesprochen. Erst später wurde zusätzlich der Begriff Membranadsorption eingeführt, der heute ein terminus technicus geworden ist. Der Begriff Membranchromatographie hat aber weiterhin seine Berechtigung und wird in vielen wissenschaftlichen Publikationen auch für Ionen-austauschende Membranadsorber verwendet (Gebauer et al., 1997; Zeng und Ruckenstein, 1999; Plate et al., 2006). Außerdem kann durch die Vielzahl an Membranadsorbern mit unterschiedlichsten, auch hydrophoben und salztoleranten Liganden, je nach Bauform und Versuchsbedingungen auch Chromatographie im herkömmlichen Sinne betrieben werden (Zeng und Ruckenstein, 1999; Ghosh, 2002). Von der Firma Sartorius werden sämtliche Membranadsorber, auch die in dieser Arbeit verwendeten ionenaustauschenden Membranadsorber mit der Bezeichnung Sartobind S, als Membranadsorber zur Ionenaustausch- bzw. zur Membranchromatographie vertrieben (Quelle: Sartorius AG, Göttingen, Deutschland).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung von Heidelbeerproben und Produkten

Zur Quantifizierung der Inhaltsstoffe frischer Heidelbeerproben sowie zur Analyse der Zusammensetzung daraus hergestellter Extrakte und Produkte musste zunächst eine geeignete HPLC-Methode entwickelt werden. Dazu wurde eine etablierte Methode zur Bestimmung von Anthocyanen in Buntsäften genutzt (Hillebrand, 2004; Quast, 2008) und für die Bestimmung der 15 in der Wildheidelbeere enthaltenen Anthocyane optimiert. Mit der optimierten Methode wurde ein kommerziell erhältlicher Heidelbeerextrakt charakterisiert sowie eine zweijährige Stabilitätsüberwachung durch Bestimmung des Anthocyanprofiles und Anthocyangehaltes durchgeführt. Zusätzlich wurden frische Wildheidelbeerproben verschiedener deutscher Regionen untersucht und ihre Anthocyanprofile und -Gehalte verglichen. Der Vergleich dieser Untersuchung mit dem kommerziell erhältlichen Heidelbeerextrakt lieferte einen Qualitäts- und Authentizitätsbeweis. Auch Stabilitätsuntersuchungen an diversen Heidelbeerprodukten wurden mittels der Methode realisiert. Zuletzt war die optimierte HPLC-Methode auch sehr hilfreich bei der Fraktionierung des Extraktes und der Entwicklung einer neuartigen membranchromatographischen Methode, denn es konnten sowohl Anthocyane als auch Copigmente parallel bestimmt und die Trennleistung der Systeme direkt beurteilt werden. Die weitere Analytik der untersuchten Proben erfolgte durch photometrische Methoden. Der Gesamtphenolgehalt der Proben wurde nach Folin-Ciocalteu und die antioxidativen Aktivitäten mittels TEAC Assay bestimmt.

3.1.1 Optimierung einer HPLC-Methode für Heidelbeeranthocyane

Für die Bestimmung der Heidelbeerinhaltsstoffe wurde die Methode zur Bestimmung von Anthocyanen in Buntsäften (Hillebrand, 2004; Quast, 2008) soweit optimiert, dass alle in einem kommerziell erhältlichen Heidelbeerextrakt der Firma Kaden enthaltenen Anthocyane vollständig voneinander getrennt werden konnten. Dazu wurde zunächst die Partikelgröße des Trägermaterials verringert. Dies erfolgte durch einen Umstieg von einer Luna C18 Säule mit 5 µm Partikelgröße auf eine Luna C18 Säule mit 3 µm Partikelgröße, um schmalere Peaks und eine höhere Trennschärfe zu erreichen. Zusätzlich wurde der Gradient des bestehenden Fließmittelsystems aus Wasser, Acetonitril und Ameisensäure von 60 min auf 90 min ausgedehnt und optimiert. Durch die etwas polareren Anfangsbedingungen gegenüber der etablierten Methode sowie einem flacher ansteigenden Gradienten, d. h. langsames Ansteigen der unpolareren Fließmittelkomponente B, konnten nicht nur alle 15 in dem Extrakt enthaltenen Anthocyane, sondern auch wichtige Copigmente wie Chlorogensäure (5-CQA) und Quercetin voneinander getrennt und mittels HPLC-DAD-MS identifiziert werden. Eine Übersicht über die verwendete HPLC-Methode, das Fließmittelsystem und den optimierten Gradienten findet sich im Material und Methodenteil (Kapitel 5.5.1).

Anthocyane besitzen charakteristische UV/Vis Spektren mit Absorptionsmaxima im Bereich von 520 und 280 nm. Aufgrund unterschiedlicher Substituenten am B-Ring der Aglykone können sich die maximalen Absorptionen etwas unterscheiden. Abb. 3.1 zeigt die UV/Vis-Spektren von Delphinidin-3-glucosid und Cyanidin-3-glucosid aus der HPLC-DAD-Analytik des Heidelbeerextraktes.

Der Unterschied von 523 nm beim Delphinidin-3-glucosid zu 515 nm beim Cyanidin-3-glucosid gibt einen Hinweis auf das Aglykon und kann zur Charakterisierung herangezogen werden.

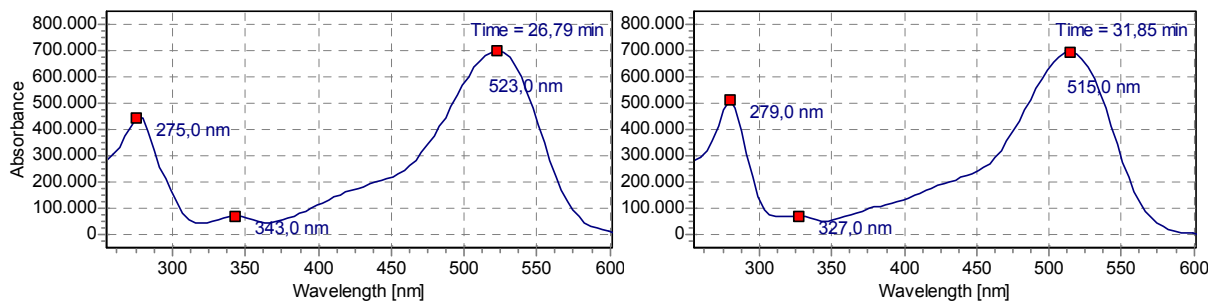


Abb. 3.1: Vergleich der UV/Vis-Spektren von Delphinidin-3-glucosid (links) und Cyanidin-3-glucosid (rechts).

Abb. 3.2 zeigt das mittels der optimierten Methode gemessene Chromatogramm des Heidelbeerextraktes bei der Absorptionswellenlänge von 520 nm sowie das zugehörige HPLC-DAD-Chromatogramm. Bei 520 nm sind 19 Peaks von Hauptkomponenten zu sehen, die zusätzlich bei einer Wellenlänge von 280 nm im HPLC-DAD-Chromatogramm die charakteristischen Absorptionsmaxima der Anthocyane aufweisen.

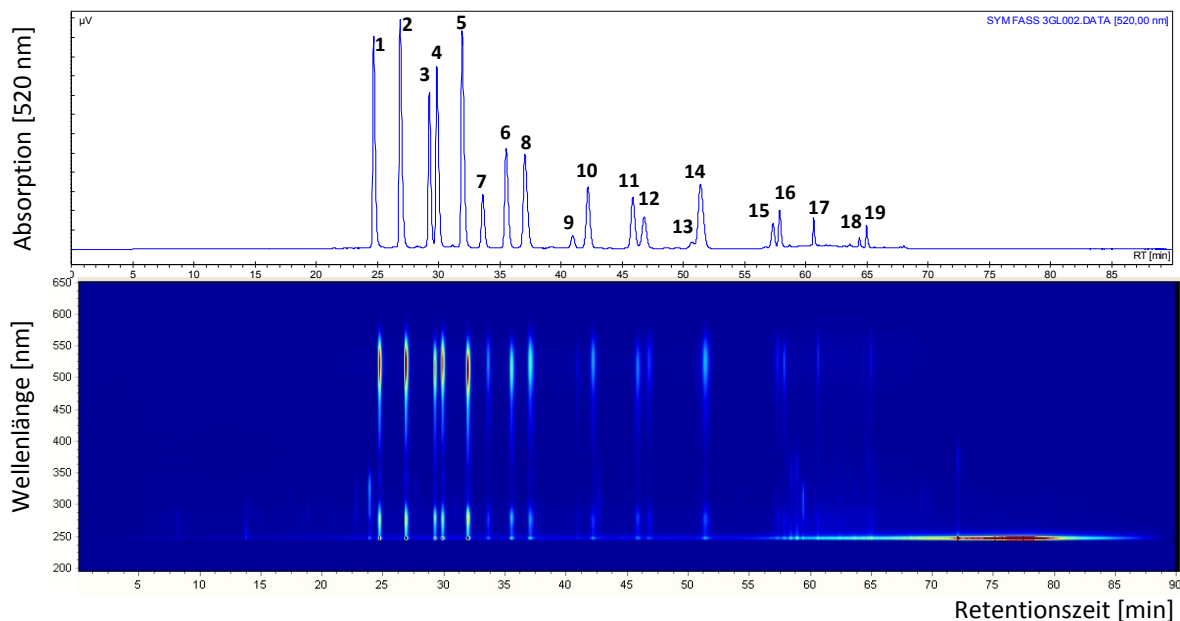
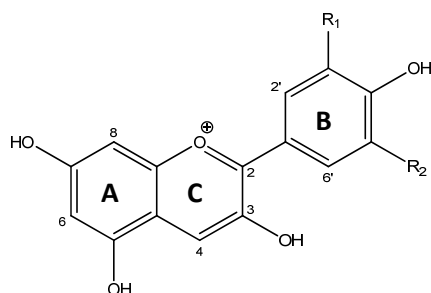


Abb. 3.2: HPLC-DAD-Chromatogramm des Heidelbeerextraktes (unten) sowie das zugehörige Chromatogramm bei 520 nm.

Bei den 15 Anthocyanen des Wildheidelbeerextraktes handelt es sich um die 3-O-Glykoside, 3-O-Galactoside und 3-O-Arabinoside der Anthocyanidine Delphinidin, Cyanidin, Petunidin, Peonidin und Malvidin. Die Abb. 3.3 zeigt die Struktur der jeweiligen Aglykone der Wildheidelbeere. Im HPLC-Chromatogramm eluieren die Anthocyane in folgender Reihenfolge:

Delphinidin-3-galactosid (1), Delphinidin-3-glucosid (2), Cyanidin-3-galactosid (3), Delphinidin-3-arabinosid (4), Cyanidin-3-glucosid (5), Petunidin-3-galactosid (6), Cyanidin-3-arabinosid (7), Petunidin-3-glucosid (8), Peonidin-3-galactosid (9), Petunidin-3-arabinosid (10), Peonidin-3-glucosid

(11), Malvidin-3-galactosid (12), Peonidin-3-arabinsid (13), Malvidin-3-glucosid (14), Malvidin-3-arabinsid (15).



	R ₁	R ₂	MW [g/mol]
Delphinidin (Del)	OH	OH	303
Cyanidin (Cy)	OH	H	287
Petunidin (Pet)	OH	OCH ₃	317
Peonidin (Peo)	OCH ₃	H	301
Malvidin (Mal)	OCH ₃	OCH ₃	331

Abb. 3.3: Strukturen der Aglykone (Anthocyanidine) im Heidelbeerextrakt.

Bei den Peaks 16-19 handelt es sich um die im Extrakt enthaltenen freien Aglykone, also um die Anthocyanidine Cyanidin (16), Petunidin (17), Peonidin (18) und Malvidin (19). Delphinidin wurde ebenfalls mittels HPLC-ESI-MS identifiziert, koeluiert bei der verwendeten Methode allerdings mit dem Petunidin-3-arabinsid. Die Identifizierung der Anthocyane erfolgte anhand der UV-Spektren und der erhaltenen Fragmentierung aus den durchgeführten HPLC-DAD und HPLC-ESI-MSⁿ-Analysen, dargestellt in Tab. 3.1.

Tab. 3.1: UV/Vis-Absorption und LC-ESI-MSⁿ-Daten der Heidelbeeranthocyane

Peak Nr.	Anthocyan	λ_{\max} [nm]	ESI-MS [M+H] ⁺	(positiver Modus) MS ² [m/z]	t _R [min]
1	Delphinidin-3-galactosid	523, 275	465	303	24,7
2	Delphinidin-3-glucosid	523, 275	465	303	26,9
3	Cyanidin-3-galactosid	515, 279	449	287	29,3
4	Delphinidin-3-arabinsid	523, 275	435	303	29,9
5	Cyanidin-3-glucosid	515, 279	449	287	31,9
6	Petunidin-3-galactosid	523, 279	479	317	33,6
7	Cyanidin-3-arabinsid	515, 279	419	287	35,5
8	Petunidin-3-glucosid	523, 275	479	317	37,1
9	Peonidin-3-galactosid	515, 279	463	301	41,0
10	Petunidin-3-arabinsid	527, 275	449	317	42,2
11	Peonidin-3-glucosid	515, 279	463	301	45,9
12	Malvidin-3-galactosid	527, 279	493	331	46,8
13	Peonidin-3-arabinsid	515, 279	433	301	50,7
14	Malvidin-3-glucosid	527, 275	493	331	51,4
15	Malvidin-3-arabinsid	527, 279	463	331	57,3

Glucoside und Galactoside, die mittels der ESI-MS-Spektren nicht unterscheidbar sind, wurden durch Standardsubstanzen anhand ihrer unterschiedlichen Retentionszeiten identifiziert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Elutionsreihenfolge bei der verwendeten HPLC-Methode durch die Zuckerreste der Aglykone bestimmt wird. Bei identischem Aglykon eluiert zuerst das Galactosid, gefolgt vom Glucosid und zuletzt das Arabinsid. Zusätzlich bestimmen die Reste R₁ und R₂ am B-Ring der Aglykone aufgrund der resultierenden unterschiedlichen Polaritäten die Elutionsreihenfolge. Hierbei eluieren die Delphinidin-Glykoside mit insgesamt drei Hydroxylgruppen am B-Ring zuerst,

während die unpolaren Malvidin-Glykoside mit zwei Methoxygruppen als Reste R_1 und R_2 am B-Ring zuletzt eluieren.

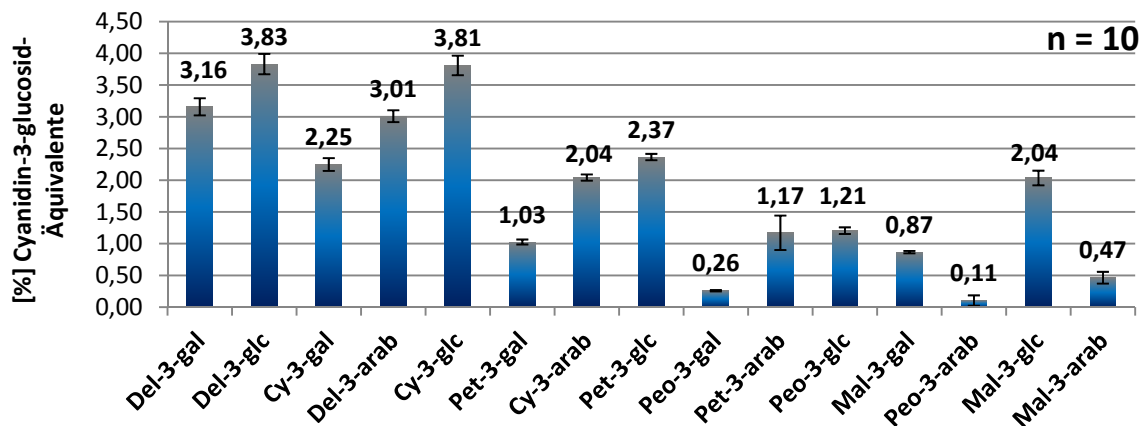


Abb. 3.4: Anthocyanprofil des kommerziellen Heidelbeerextraktes.

Die Quantifizierung der Anthocyane im Heidelbeerextrakt erfolgte als Cyanidin-3-glucosid-Äquivalente mit Hilfe der im Material und Methodenteil beschriebenen Methode (siehe Kapitel 5.5.1). Die Abb. 3.4 zeigt das so erhaltene Anthocyanprofil des kommerziellen Heidelbeerextraktes. Betrachtet man die Zuckerreste der fünf im Extrakt vorkommenden Anthocyane, so sind jeweils die Glucoside dominierend, gefolgt von den Galactosiden und den Arabinosiden. Unabhängig von den Zuckerresten sind jeweils die Delphinidin- und Cyanidinglykoside mit 10,00% bzw. 8,10% vorherrschend, gefolgt von den Petunidin-Glykosiden mit 4,57%, den Malvidin-Glykosiden mit 3,37% und den Peonidin-Glykosiden, die mit insgesamt 1,57% den geringsten Anthocyananteil (Abb. 3.5) im Extrakt ausmachen. Der Gesamtanthocyangehalt des Extraktes betrug $27,62 \pm 1,42\%$.

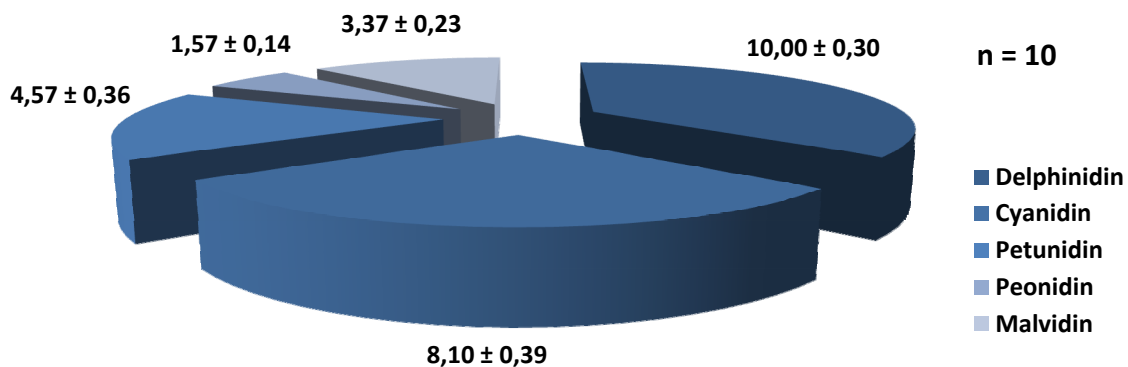


Abb. 3.5: Prozentuale Gehalte der Anthocyanglykoside im Heidelbeerextrakt.

Da der Extrakt und einzelne Extraktfraktionen im Rahmen des Clusterprojektes „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“ (FEI) als Modellextrakt für die Verkapselung von Anthocyanen sowie für die Entwicklung einer membran chromatographischen Methode zur Isolierung von Anthocyanen genutzt werden sollte, wurde der Anthocyangehalt und das Anthocyanprofil des Extraktes über einen Lagerzeitraum von 2 Jahren untersucht. Die Probenahme fand in Intervallen von drei Monaten statt. Die Analytik ergab, dass sowohl bei Raumtemperatur (25°C) als auch bei Kühlung (-18°C), jeweils unter Feuchtigkeits-, Licht- und Sauerstoff-Ausschluss keine Veränderung des Anthocyanprofils, des Gesamtanthocyangehaltes von 27,6%, der antioxidativen Aktivität 3540 $\mu\text{mol/g}$ (TEAC-Assay als Trolox-Äquivalente) sowie des

Gesamtpolyphenolgehaltes von 53,5 g/100g (Folin-Ciocalteu als Gallussäure-Äquivalente) festgestellt werden konnte. Abb. 3.6 zeigt den Verlauf der Anthocyangehalte während der Lagerung.

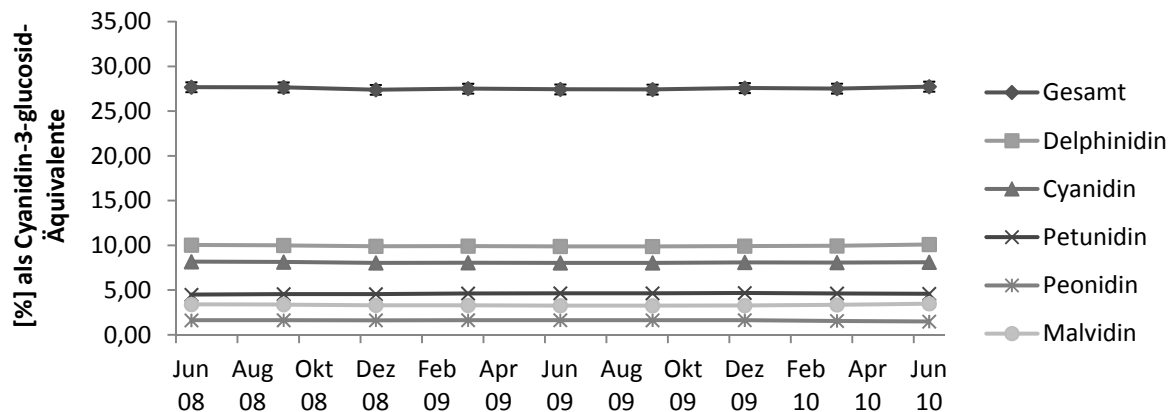


Abb. 3.6: Anthocyangehalte im Heidelbeerextrakt während der zweijährigen Lagerung.

Mit dieser Untersuchung konnte sichergestellt werden, dass der unter den genannten Bedingungen gelagerte Extrakt keine Veränderung des Anthocyanprofiles und -gehaltes zeigt. Dadurch wurde gewährleistet, dass in allen Arbeitsgruppen über den gesamten Projektzeitraum mit dem gleichen Ausgangsprodukt gearbeitet wurde. Auch für die Industrie ist die Stabilitätsuntersuchung ein wichtiger Hinweis auf die Lagerfähigkeit getrockneter anthocyanhaltiger Extrakte. Während sich der Extrakt über den untersuchten Zeitraum stabil zeigte, unterliegen Anthocyane in Lösungen wie Säften oder in anderen wasserhaltigen Heidelbeerprodukten einem recht schnellen Abbau (Hillebrand, 2004; Quast, 2008). Dieser Abbau konnte auch in Wildheidelbeerprodukten durch die optimierte HPLC-Methode im Rahmen des Teilprojektes 1 des Clusterprojektes „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“ (FEI) bestätigt werden (vergl. Kapitel 3.1.3).

3.1.2 Charakterisierung frischer Heidelbeerproben

Um den kommerziellen Wildheidelbeerextrakt weiter zu charakterisieren und seine Authentizität zu überprüfen, wurde das Anthocyanprofil des Extraktes mit dem Anthocyanprofil von Wildheidelbeeren (*Vaccinium myrtillus*) und Kulturheidelbeeren (*Vaccinium corymbosum*) verglichen. Dazu wurden frische Heidelbeerproben verschiedener Regionen Deutschlands im August zweier aufeinanderfolgender Jahre (Erntezeitraum: Juli-September) von Hand gesammelt und mittels HPLC analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass das Anthocyanprofil des Extraktes, gezeigt im vorhergehenden Kapitel in Abb. 3.2, weitgehend demjenigen der europäischen Wildheidelbeere, gezeigt anhand des HPLC-Chromatogrammes in Abb. 3.7, entspricht. Die im Extrakt vorhandenen Anthocyanidine konnten in den frischen Heidelbeeren nicht nachgewiesen werden. Sie entstehen erst im Zuge der Extrakterstellung durch die Abspaltung der Zuckerbausteine infolge einer säurekatalysierten Hydrolyse.

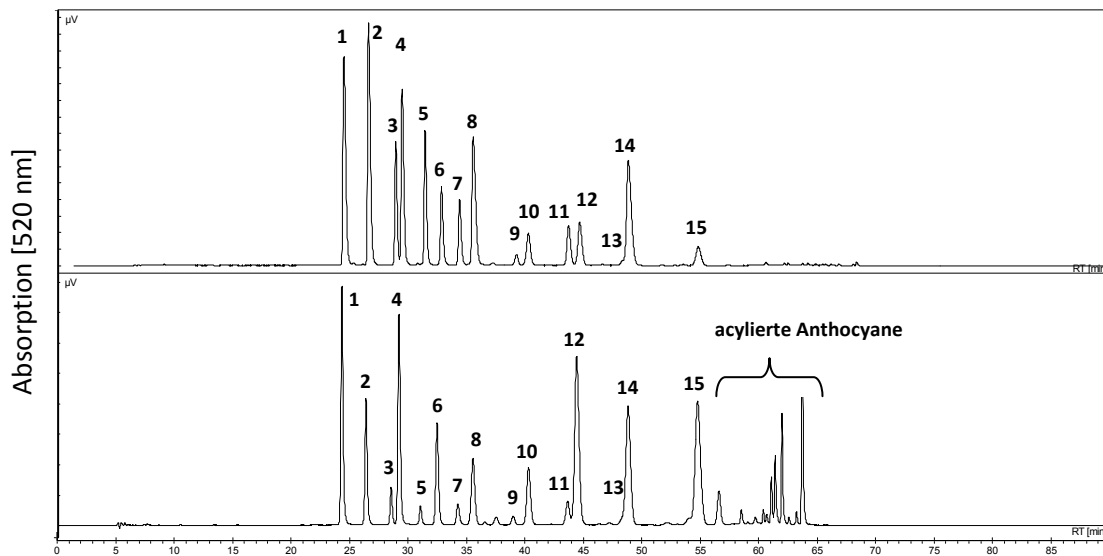


Abb. 3.7: Vergleich der HPLC-Chromatogramme frischer Wild- (oben) und Kulturheidelbeeren (unten): Delphinidin-3-galactosid (1), Delphinidin-3-glucosid (2), Cyanidin-3-galactosid (3), Delphinidin-3-arabinsosid (4), Cyanidin-3-glucosid (5), Petunidin-3-galactosid (6), Cyanidin-3-arabinsosid (7), Petunidin-3-glucosid (8), Peonidin-3-galactosid (9), Petunidin-3-arabinsosid (10), Peonidin-3-glucosid (11), Malvidin-3-galactosid (12), Peonidin-3-arabinsosid (13), Malvidin-3-glucosid (14), Malvidin-3-arabinsosid (15).

Beim Vergleich der in Abb. 3.7 gezeigten HPLC-Chromatogramme von frischen Wild- und Kulturheidelbeeren werden deutliche Unterschiede zwischen den Anthocyanprofilen sichtbar. Abb. 3.8 zeigt die quantitative Auswertung dieser Messungen im Vergleich zu dem kommerziellen Heidelbeerextrakt. Im Profil angegeben sind die prozentualen Gehalte der 15 in der Wildheidelbeere vorkommenden Anthocyane, in Bezug auf den jeweiligen Gesamtanthocyangehalt der Probe. Die ausschließlich in der Kulturheidelbeere vorkommenden acylierten Anthocyane (Gao und Mazza, 1994), die im Rahmen der Untersuchung mittels HPLC-ESI-MS identifiziert wurden, sind bei dieser prozentualen Auswertung außer Acht gelassen worden, denn sie waren auch im kommerziellen Extrakt nicht nachzuweisen. Dies war ein erster Hinweis für die Authentizität des Wildheidelbeerextraktes sowie die ausschließliche Verwendung von Wildheidelbeeren zur Extrakterstellung.

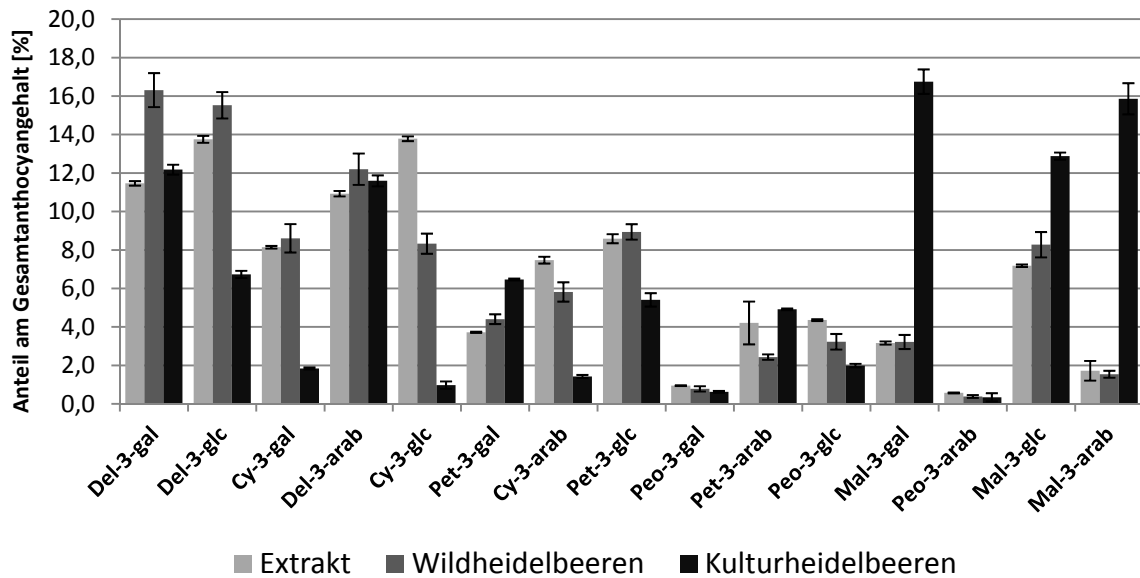


Abb. 3.8: Anthocyanprofil von Wildheidelbeeren, Kulturheidelbeeren und Heidelbeerextrakt.

Der Vergleich der Anthocyanprofile zeigte außerdem, dass in der Wildheidelbeere und im Wildheidelbeerextrakt die Delphinidin- und Cyanidin-Glykoside vorherrschen, während die Petunidin- und Malvidin-Glykoside viel geringere Gehalte zeigen. In den Kulturheidelbeeren überwiegen dagegen eindeutig die Malvidin-Glykoside, gefolgt von den Delphinidin-, Petunidin- und Cyanidin-Glykosiden. Peonidin-Glykoside zeigen sowohl in der Wild- als auch in der Kulturheidelbeere die geringsten Beiträge zum Gesamtanthocyangehalt. Der Vergleich der verschiedenen Glykoside, unabhängig von deren Aglykonen macht dagegen deutlich, dass sowohl im Wildheidelbeerextrakt als auch in den frischen Wildheidelbeeren die Galactoside und Glucoside überwiegen, während die Arabinoside den geringsten Beitrag zum Gesamtanthocyangehalt leisten (siehe Abb. 3.9). In der Kulturheidelbeere weisen dagegen die Galactoside und Arabinoside gegenüber den Glucosiden höhere Gehalte auf.

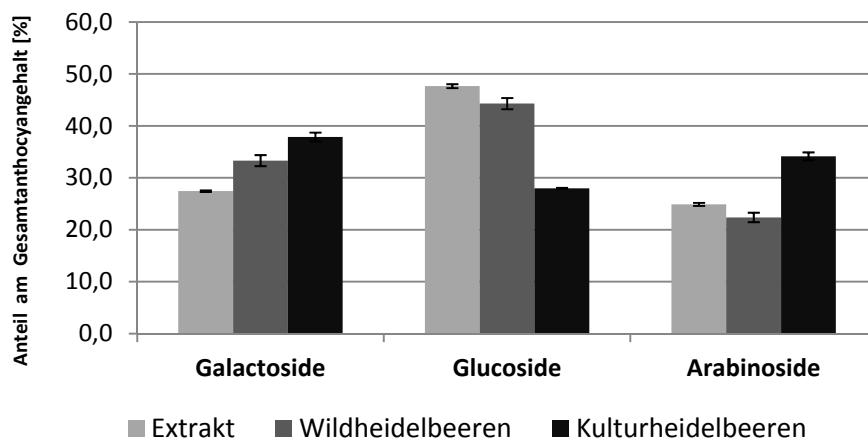


Abb. 3.9: Verteilung der Glykoside in Wildheidelbeeren, Kulturheidelbeeren und im Extrakt.

Um zu zeigen, wie die Anthocyanprofile in zwei aufeinander folgenden Jahren variieren, ist die prozentuale Verteilung der Anthocyane nach ihren Aglykonen im Zweijahresvergleich zwischen den Regionen Norddeutschland und Süddeutschland in Abb. 3.10 dargestellt. Dabei wurden in den zwei aufeinander folgenden Jahren etwas höhere Gehalte an Delphinidin-Glykosiden bei den

norddeutschen gegenüber den süddeutschen Heidelbeerproben festgestellt. In Süddeutschland leisteten dagegen die Cyanidin-Glykoside insgesamt einen etwas höheren Beitrag zum Gesamtanthocyangehalt.

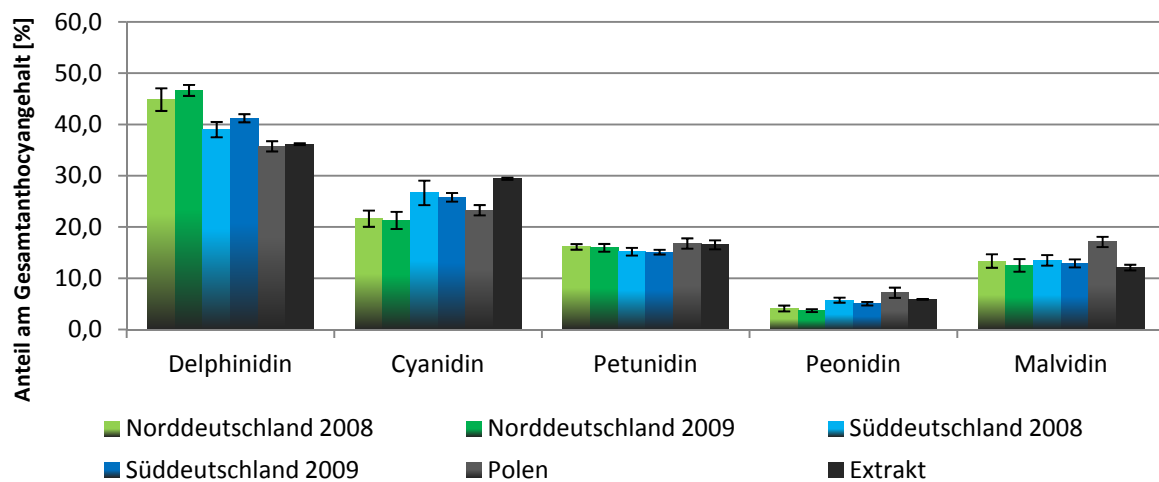


Abb. 3.10: Verteilung der Aglykone im Gesamtanthocyangehalt frischer norddeutscher, süddeutscher und polnischer Heidelbeeren, sowie im Heidelbeerextrakt.

Von Interesse war auch das Verhältnis der Anthocyan-Zusammensetzung von Heidelbeerproben aus unterschiedlichen Höhenlagen. Der Vergleich zwischen Proben aus dem niedersächsischen Harz (> 300 m ü. NN) und Proben aus flacheren Regionen Niedersachsens (< 300 m ü. NN), dargestellt in Abb. 3.11, gibt Aufschluss darüber. Die Proben aus dem Harz zeigten zumindest für das Jahr 2008 höhere Gehalte an Delphinidin- und Cyanidin-Glykosiden, während die Proben aus den flacheren Gebieten Niedersachsens etwas höhere Gehalte an Petunidin und Malvidin gegenüber den höheren Lagen zeigten. Allerdings liegen diese Gehaltsunterschiede und Schwankungsbreiten innerhalb eines Größenbereichs, wie er auch in zwei aufeinander folgenden Jahren in einer Region beobachtet werden kann. Dies wird deutlich, wenn man die Delphinidin- und Cyanidin-Glykosid-Gehalte der niedersächsischen Proben von 2008 und 2009 betrachtet. Dann zeigen sich ähnlich große Gehaltsunterschiede wie beispielsweise bei den Proben aus Nord- und Süddeutschland.

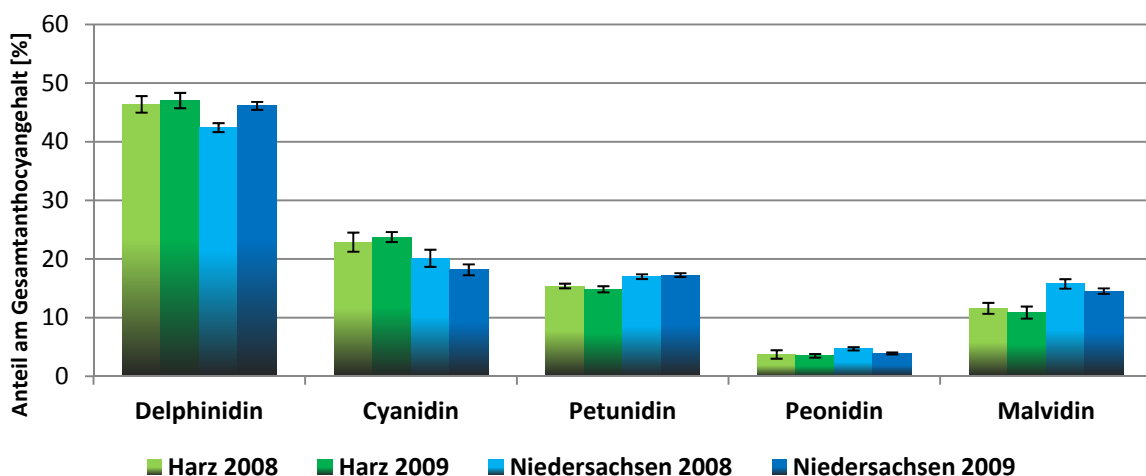


Abb. 3.11: Verteilung der Aglykone in Heidelbeerproben aus dem Harz und dem restlichen Niedersachsen im Zweijahresvergleich.

Zuletzt wurden die Anthocyanprofile von Proben gleicher Fundorte miteinander verglichen (siehe Abb. 3.12). Hier machte der Zweijahresvergleich deutlich, dass es auch bei identischen Fundorten in zwei aufeinander folgenden Jahren zu ähnlich großen Schwankungsbreiten im Anthocyanprofil kommt, wie innerhalb des Gesamtvergleichs zwischen Nord- und Süddeutschland.

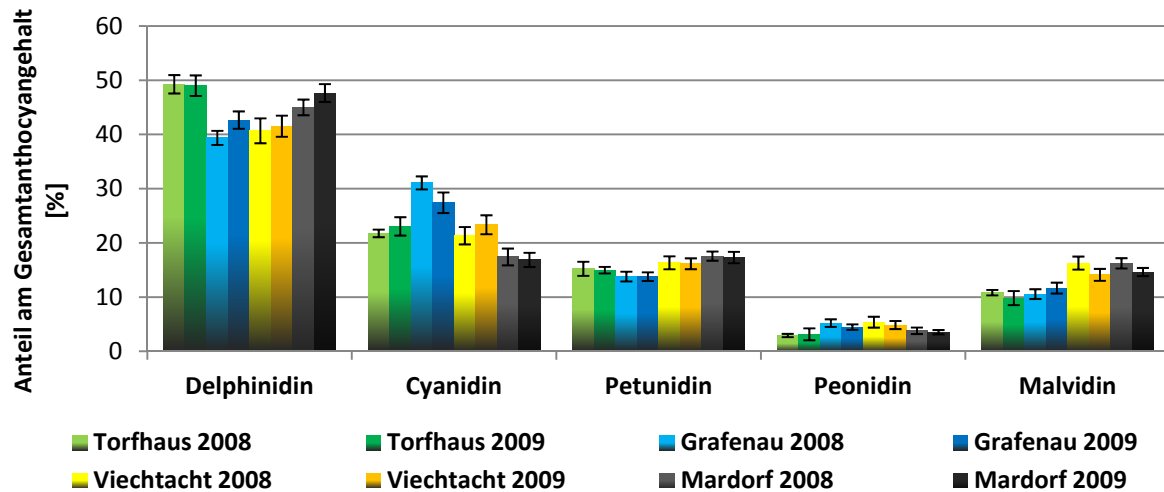


Abb. 3.12: Verteilung der Aglykone im Gesamtanthocyangehalt von Proben gleicher Herkunft in zwei aufeinanderfolgenden Jahren im Vergleich.

Diese Tatsache spricht dafür, dass es allein anhand des Anthocyanprofiles der Wildheidelbeere nicht möglich ist, Rückschlüsse auf deren Herkunftsregion innerhalb Deutschlands zu ziehen. In einer Studie an finnischen Heidelbeerproben (Lätti et al., 2008) konnte bereits eine Ortsabhängigkeit des Anthocyanprofiles nach Breitengraden zu höheren Delphinidin-Gehalten in nördlicheren und höheren Cyanidin-Gehalten in südlicheren Regionen festgestellt werden. Bei der hier gezeigten Untersuchung konnte dies für die deutschen Proben nicht eindeutig bestätigt werden. Selbst wenn es einen solchen Einfluss auf das Anthocyanprofil der Heidelbeere gibt, so haben die nicht direkt fundortabhängigen Faktoren wie Niederschlagsmenge, Sonneneinstrahlung, Reifegrad und der Erntezeitpunkt einen mindestens ebenso großen Einfluss wie die direkt ortsabhängigen Faktoren, z. B. die Beschaffenheit des Bodens oder die Höhenlage über dem Meeresspiegel. Es gelingt nicht, aus dem Anthocyanprofil der deutschen Wildheidelbeeren Rückschlüsse über deren Herkunft zu ziehen. Auch aus dem Anthocyanprofil des kommerziellen Heidelbeerextraktes, gezeigt in Abb. 3.10, lassen sich keine Aussagen über die Herkunft der für seine Herstellung verwendeten Wildheidelbeeren treffen. Das Anthocyan-Profil des Extraktes zeigt lediglich, dass die Gehalte der einzelnen Anthocyane in ihrer natürlichen Schwankungsbreite dem typischen Anthocyan-Profil der Wildheidelbeere entsprechen. Somit ist sichergestellt, dass es sich nicht um einen Extrakt aus Kulturheidelbeeren handeln kann, da ein solcher Extrakt deutliche Abweichungen im Anthocyanprofil aufweisen würde.

Zusätzlich zu den Anthocyan-Profilen wurden auch die Trockensubstanzgehalte der Heidelbeeren (siehe Kapitel 5.5.5.1), die antioxidative Aktivität mittels TEAC-Assay (siehe Kapitel 5.5.4.3), der Gesamtpolyphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu (siehe Kapitel 5.5.4.4) sowie der Gesamtanthocyangehalt mittels HPLC bestimmt. Tab. 3.2 gibt Auskunft über die Trockensubstanzgehalte und die Ergebnisse der photometrischen Bestimmungen der Heidelbeerproben. Die Schwankungsbreite beim Trockensubstanzgehalt betrug zwischen 10,65 - 16,25% des Frischgewichtes. Im Durchschnitt enthielten die Heidelbeeren somit 86,89% Wasser.

Tab. 3.2: Überblick über die Trockenmassen, den Gesamtpolyphenolgehalt und die antioxidative Aktivität frischer Wildheidelbeerproben aus dem Jahre 2008.

Nr.	Wildheidelbeerprobe		Trocken- masse [%]	Gesamt- polyphenol- gehalt [mg / 100 g]*	TEAC [μmol Trolox / g]
Norddeutschland					
1	Harz 1	Wurmberg	14,02	812,65	51,62
2	Harz 2	Lerchenköpfe	12,84	714,17	47,77
3	Harz 3	Torfhaus	13,09	805,90	51,22
4	Harz 4	Goslar, oberer Schieferweg	12,38	870,05	53,10
5	Harz 5	Schulenberg	12,45	766,48	50,16
6	Harz 6	St. Andreasberg	14,27	930,42	61,95
7	Harz 7	St. Andreasberg, Rehberg	14,27	1032,43	63,91
8	Lüneburger Heide 1	Eschede	12,73	674,30	42,23
9	Lüneburger Heide 2	Hösseringen, Suderburg	12,14	817,52	49,77
10	Niedersachsen 1	Celle	13,97	617,73	39,50
11	Niedersachsen 2	Eilvese, Grinder Wald	11,15	625,26	41,37
12	Niedersachsen 3	Ottbergen, Kapellenberg	10,65	595,55	39,34
13	Niedersachsen 4	Mardorf, Hochmoor	11,73	531,91	37,60
Mittelwert Norddeutschland			12,74	753,41	48,43
Süddeutschland					
14	Bayerischer Wald 1	Viechtacht, großer Pfahl	12,32	735,77	47,45
15	Bayerischer Wald 2	Grafenau, Kleblmühle	13,3	764,33	48,43
16	Bayerischer Wald 3	Ergolding	15,8	830,30	50,42
17	Oberpfalz	Leuchtenberg, Burgmühle	13,77	597,37	40,32
18	Schwarzwald 1	Lauterbach	16,25	713,06	43,81
19	Schwarzwald 2	Harzköpfe	12,18	663,03	42,69
Mittelwert Süddeutschland			13,94	717,31	45,52
Ausland					
20	Finnland	Helsinki	15,15	753,76	49,45
21	Polen	unbekannt	12,56	858,62	44,74
22	Rumänien	unbekannt	11,47	1082,24	55,65
Mittelwert Ausland			13,06	898,21	49,95

*Gallussäure Äquivalente.

Auch die Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes der Heidelbeerproben, quantifiziert als Gallussäure-Äquivalente, und die Bestimmung der antioxidativen Aktivität lieferte keine Hinweise auf regionsabhängige Unterschiede. Die Werte des Gesamtpolyphenolgehaltes streuten regionsunabhängig von 531 bis 1082 mg um den Mittelwert von 763 mg pro 100 g frischer Beeren, die durchschnittliche antioxidative Aktivität der Beeren betrug 47,85 μmol Trolox pro Gramm, wobei die Werte in einem Bereich von 37 bis 64 μmol Trolox/g streuten. Im Jahr 2008 gab es in der Region Harz im Durchschnitt und auch bei einzelnen Proben, z. B. Rehberg in St. Andreasberg mit einem

Gesamtpolyphenolgehalt von 1032 mg pro 100 g Frischgewicht und einer antioxidativen Aktivität von 63,91 μmol Trolox pro Gramm, überdurchschnittliche hohe Werte. Ein Jahr später konnte dies nicht mehr bestätigt werden, da sämtliche Proben aus dieser Region 2009 nur noch mittlere antioxidative Aktivitäten und durchschnittliche Gesamtpolyphenolgehalte zeigten.

Sehr von Interesse waren die ermittelten Durchschnittswerte als Vergleichswerte zum kommerziellen Heidelbeerextrakt. Hier ergab sich rechnerisch, dass 1 g des Extraktes mit seinem Gesamtpolyphenolgehalt von 53,5 g/100 g und seiner antioxidativen Aktivität von 3540 μmol Trolox/g im Vergleich etwa 72 g frischen Heidelbeeren entsprechen. Die mittels HPLC ermittelten Gesamtanthocyangehalte der frischen Heidelbeerproben lagen zwischen 0,45 und 0,84 g/100 g Frischgewicht, bei einem Mittelwert von 0,6 g/100 g. Damit lagen die Gesamtanthocyangehalte deutscher Heidelbeeren 2008 und 2009 im Mittel an der oberen Grenze der in der Literatur gefundenen Daten (Kähkönen et al., 2003; Lätti et al., 2008). Der Vergleich des Gesamtanthocyangehaltes der frischen Beeren mit dem kommerziellen Heidelbeerextrakt zeigte ein interessantes Ergebnis. Entsprachen 1 g des Extraktes aufgrund des Gesamtpolyphenolgehaltes und der antioxidativen Aktivität rechnerisch 72 g frischen Heidelbeeren, so führte die Berechnung über den Gesamtanthocyangehalt des Extraktes (27,6%) zu einer Menge von 1,5 g des Extraktes, die zugeführt werden müssten, um eine 72 g frischen Heidelbeeren entsprechende Menge an Anthocyanen aufzunehmen. Erklärbar ist dies dadurch, dass während des Herstellungsprozesses des Extraktes wahrscheinlich bereits ein Teil der Anthocyane in phenolische Verbindungen abgebaut wurde, die sich allerdings noch mittels TEAC-Assay und mit der Methode nach Folin-Ciocalteu erfassen lassen. Die Abb. 3.13 zeigt die Gesamtanthocyangehalte der Wildheidelbeerproben aus dem Jahr 2008. Die Probennummerierung entspricht der Probenzuordnung in Tab. 3.2. Die Proben aus dem Harz (1-7) zeigten 2008 im Durchschnitt die höchsten Gesamtanthocyangehalte. Unter den weiteren norddeutschen Proben konnten insgesamt allerdings auch die niedrigsten Gehalte nachgewiesen werden (8-13).

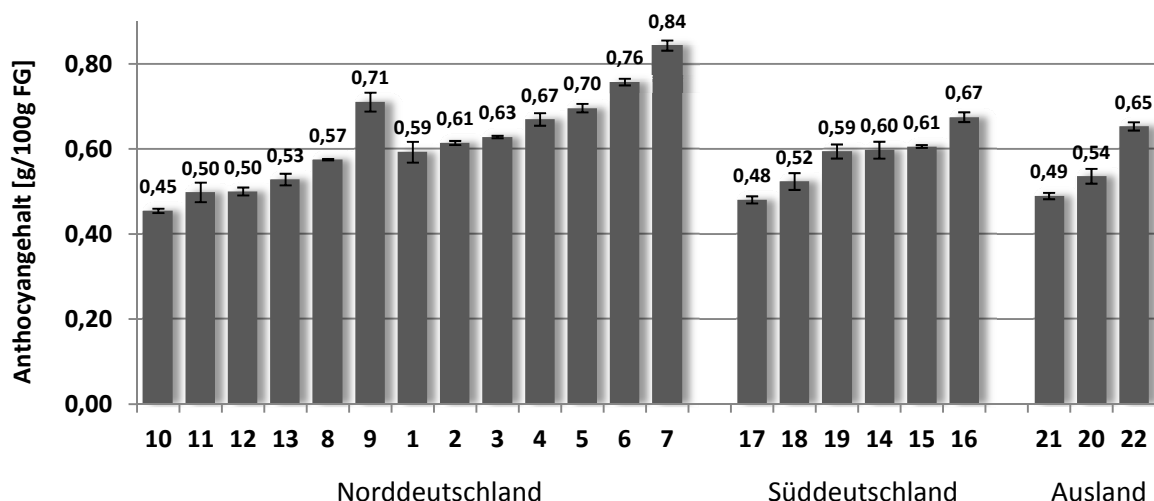


Abb. 3.13: Gesamtanthocyangehalte der Wildheidelbeerproben aus dem Jahr 2008.

Die Heidelbeerproben aus Süddeutschland zeigten im Durchschnitt ähnliche Gehalte wie die Proben aus Norddeutschland. Wahrscheinlich aufgrund der geringeren Probenanzahl gab es hier keine Ausreißer und größere Abweichungen vom Durchschnittswert, verglichen mit den norddeutschen Proben. Die Proben aus dem Ausland zeigten Gesamtanthocyangehalte, die innerhalb der Variationsbreite der deutschen Proben lagen. Die Betrachtung der durchschnittlichen

Gesamtanthocyangehalte im Zweijahresvergleich, dargestellt in Abb. 3.14, lässt keinen Trend zu erhöhten Gehalten in einer bestimmten Region erkennen. Gab es 2008 mit 0,62 mg/100 g Frischgewicht leicht höhere Werte in der norddeutschen Region gegenüber den süddeutschen Heidelbeeren (0,58 mg/100 g), so kehrten sich die Verhältnisse ein Jahr später um. Jetzt zeigten die Heidelbeeren aus Norddeutschland etwas geringere Gesamtanthocyangehalte, wofür unter anderem die Proben aus dem Harz verantwortlich waren. Diese zeigten, wie bereits erwähnt, in Übereinstimmung mit dem Gesamtpolyphenolgehalt und der antioxidativen Aktivität 2008 zunächst überdurchschnittliche Werte, während sie 2009 nur noch durchschnittliche Gesamtanthocyangehalte erreichten. Der Rekordwert aus dem Jahr 2008 bei einer Probe aus St. Andreasberg mit einem Anthocyangehalt von 0,84 mg/100 g FG konnte ein Jahr später (0,64 mg/100 g FG) bei weitem nicht mehr erreicht werden. In Süddeutschland zeigten dagegen fast alle Proben aus 2009 höhere Gesamtanthocyangehalte, wie beispielsweise bei den Proben aus Grafenau (Bayerischer Wald) oder aus Leuchtenberg (Oberpfälzer Wald), ebenfalls in Abb. 3.14 dargestellt. Das führte 2009 zu drastisch erhöhten Durchschnittswerten bei den Proben aus dieser Region (0,74 g/100 g FG) gegenüber dem Vorjahresgehalt von 0,58 g/100 g frischen Wildheidelbeeren.

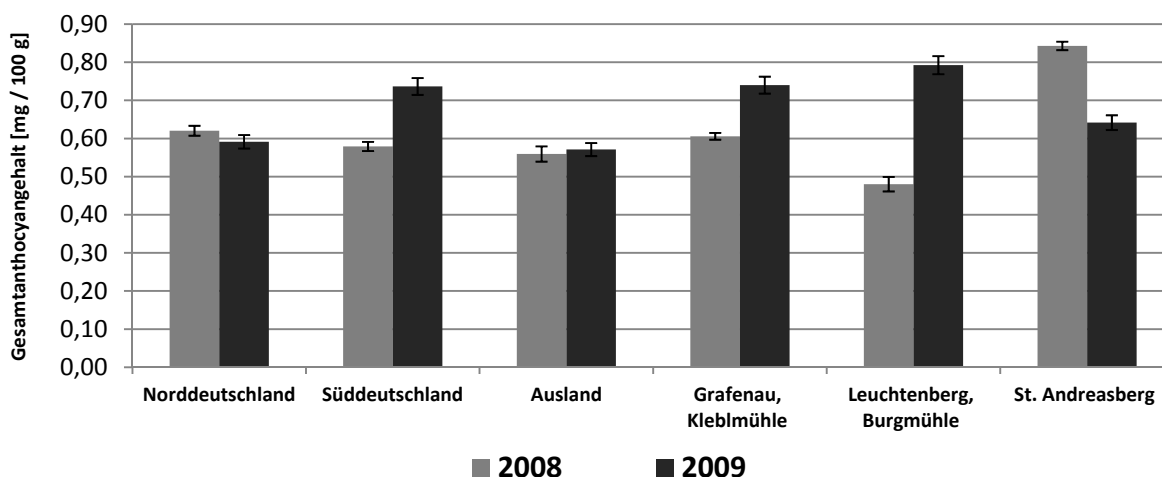


Abb. 3.14: Vergleich der durchschnittlichen Gesamtanthocyangehalte von Wildheidelbeerproben aus den Jahren 2008 und 2009.

Zusammengefasst betrachtet lassen sich anhand der Gesamtanthocyangehalte frischer Heidelbeeren in Übereinstimmung mit den gezeigten antioxidativen Aktivitäten und den Anthocyanprofilen keine regionalen Aussagen treffen. Auch hier scheinen die nicht direkt ortsabhängigen Faktoren wie der Reifegrad zum Erntezeitpunkt oder die Witterung einen mindestens gleichwertigen, wenn nicht sogar größeren Einfluss zu haben, als die ortsabhängigen Faktoren. Dies ist eine wichtige Erkenntnis für die verarbeitende Heidelbeerindustrie, für die es somit keine Rolle spielen dürfte, aus welcher Region sie ihre Heidelbeeren bezieht.

Inwieweit die ermittelten Werte, also der Gesamtanthocyangehalt, der Gesamtpolyphenolgehalt und die antioxidative Aktivität frischer Heidelbeeren zusammenhängen, geht aus der folgenden Betrachtung hervor. Abb. 3.15 zeigt, dass die auf der y-Achse aufgetragenen Werte für die antioxidativen Aktivitäten frischer Heidelbeerproben sehr gut mit den Gesamtpolyphenolgehalten korrelieren. Der Determinationskoeffizient R^2 beträgt hier 0,8171. Die hohe Korrelation bestätigt auch die Zuverlässigkeit der beiden Bestimmungsmethoden, die ähnlich selektiv die antioxidative Aktivität bzw. das reduzierende Potential der Heidelbeerproben erfassen.

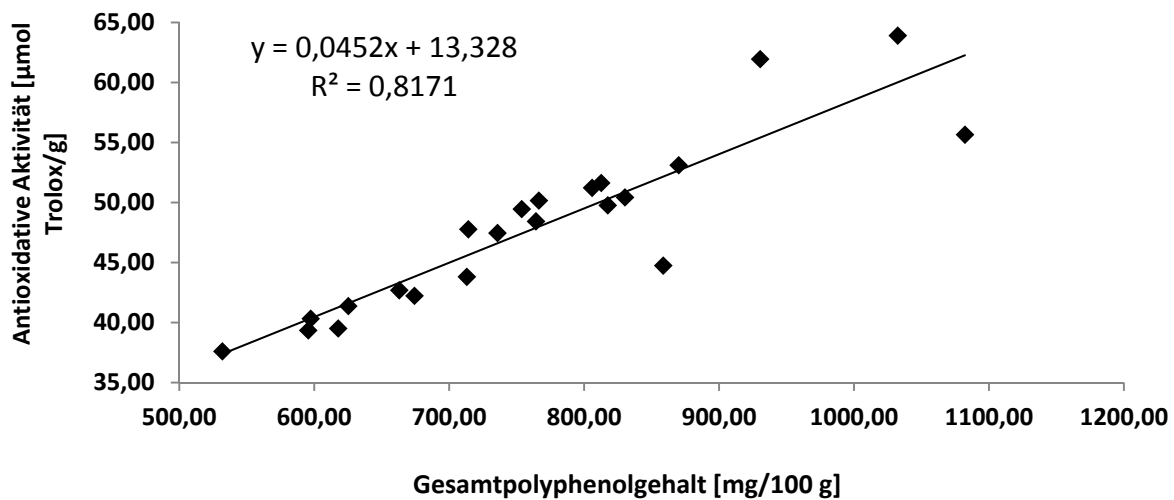


Abb. 3.15: Korrelation zwischen antioxidativer Aktivität und Gesamtpolyphenolgehalt frischer Heidelbeerproben.

Werden die antioxidativen Aktivitäten der Proben gegen die Anthocyangehalte aufgetragen (Abb. 3.16), so zeigt sich eine etwas geringere Korrelation. Dafür dürften die in der Heidelbeere enthaltenen Copigmente verantwortlich sein, die bei dieser Betrachtungsweise außer Acht gelassen werden, jedoch bei der vorherigen Betrachtung der Korrelation zwischen antioxidativer Aktivität und Gesamtpolyphenolgehalt mit erfasst wurden. Der nur etwas kleinere Determinationskoeffizient $R^2 = 0,7753$ spricht jedoch dafür, dass die Anthocyane im Vergleich zu den Copigmenten einen viel größeren Einfluss auf die antioxidative Aktivität der frischen Heidelbeeren haben. Die geringfügige Verschlechterung des Korrelationskoeffizienten zeigt jedoch auch, dass die Konzentration der Copigmente in den Heidelbeeren unabhängig von der Anthocyankonzentration ist.

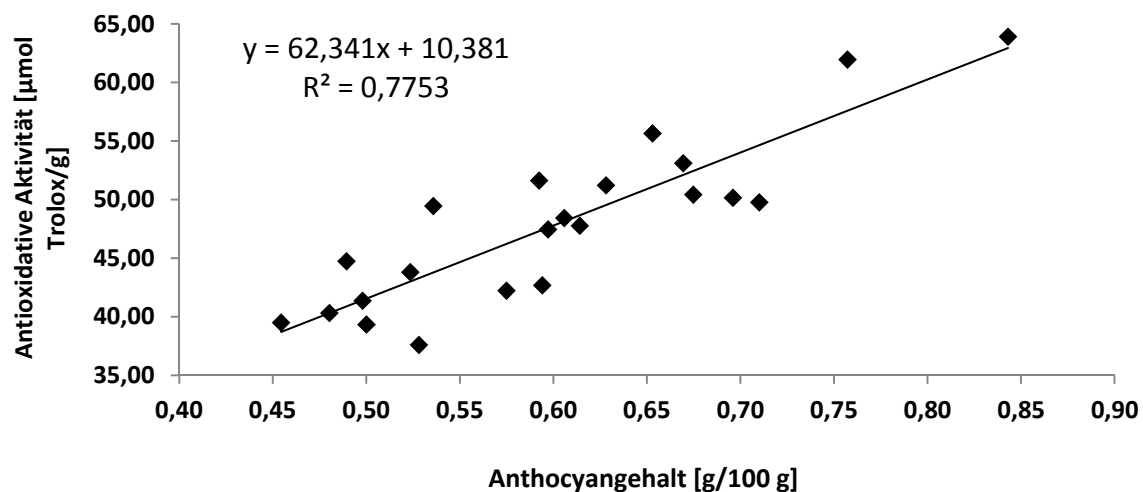


Abb. 3.16: Korrelation zwischen antioxidativer Aktivität und Gesamtanthocyangehalt frischer Heidelbeerproben.

Letzteres zeigt auch die Korrelation zwischen dem Gesamtpolyphenolgehalt und dem Gesamtanthocyangehalt in Abb. 3.17. Weil der nach Folin-Ciocalteu ermittelte Gesamtpolyphenolgehalt sowohl die Anthocyane als auch alle weiteren reduzierend wirkenden Verbindungen erfasst, spricht der viel geringere Determinationskoeffizient von $R^2 = 0,5463$ für die

Unabhängigkeit der übrigen antioxidativ wirkenden Verbindungen von der Anthocyankonzentration frischer Heidelbeeren.

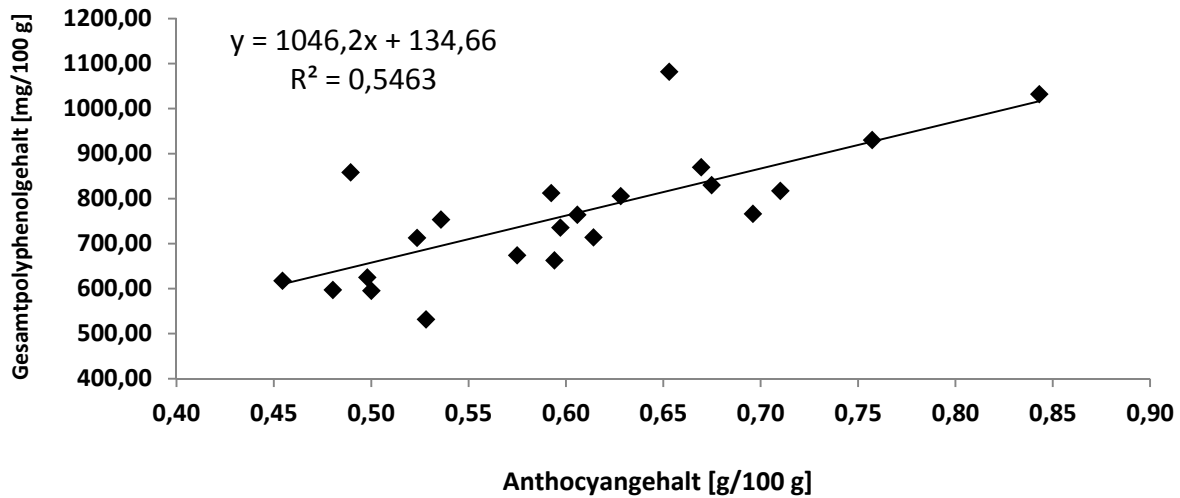


Abb. 3.17: Korrelation zwischen Anthocyangehalt und Gesamtpolyphenolgehalt frischer Heidelbeerproben.

3.1.3 Prozessanalytik und Untersuchung der Anthocyanstabilität in Heidelbeerprodukten

Zur Erfassung der Anthocyanstabilität während der Herstellung und Lagerung von Heidelbeerprodukten wurden im Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie der TU Berlin hergestellte Heidelbeerprodukte einer umfangreichen Analytik unterzogen. Neben der Überwachung auf Veränderung der Anthocyangehalte und Anthocyanprofile während ihrer Lagerung fand auch eine begleitende Prozessanalytik zur Feststellung von Produktveränderungen während des Herstellungsprozesses von Heidelbeersäften und Heidelbeerkonfitüre statt.

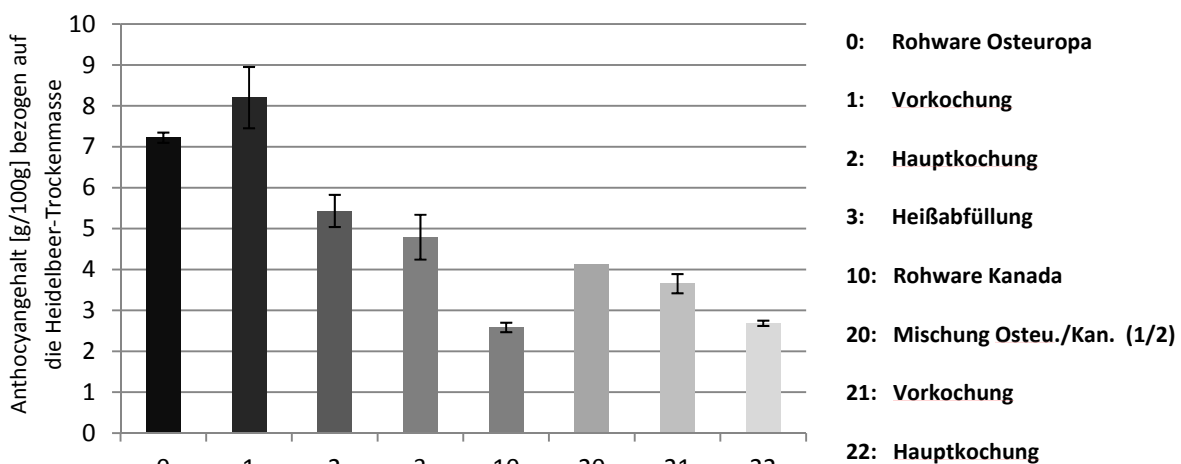


Abb. 3.18: Veränderung des Anthocyangehaltes während der einzelnen Prozessschritte der Heidelbeermarmeladen-Herstellung.

Insbesondere während des Prozessschrittes der Kochung und der Heißabfüllung von Konfitüren aus Wildheidelbeeren und einer Mischung aus Wild- und Kanadischen Kulturheidelbeeren kam es zu einem Verlust von Anthocyanen (siehe Abb. 3.18). Gleiches konnte für die Pasteurisierung von Heidelbeersäften gezeigt werden, siehe Abb. 3.19.

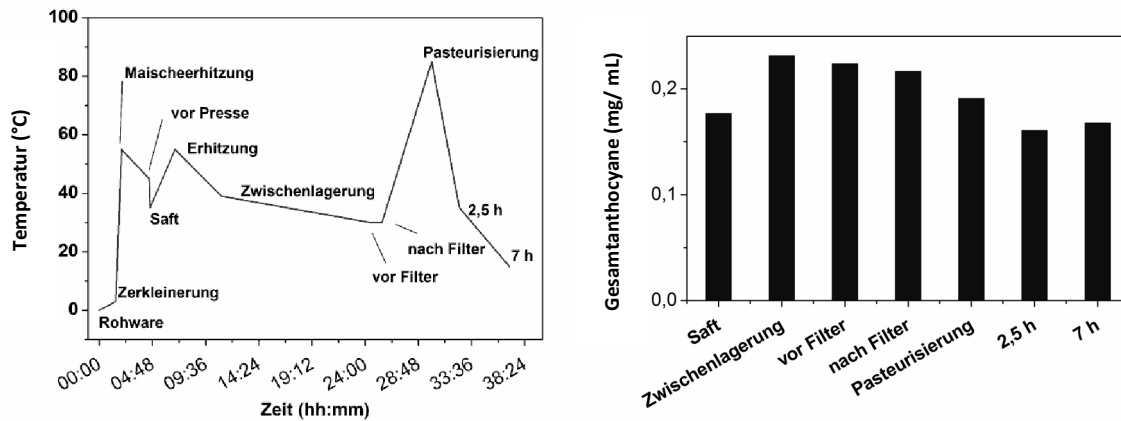


Abb. 3.19: Temperatur-Zeit-Profil der Heidelbeersaftherstellung (links) und Veränderung des Anthocyangehaltes während der einzelnen Prozessschritte (rechts) nach Jäger und Knorr in FEI .

Auch während der Lagerung von Heidelbeerprodukten wurden deutliche Veränderungen im Anthocyangehalt und Anthocyanprofil festgestellt. Nach einer Lagerperiode von 90 Tagen waren im ungeschönten Wild- und Kulturheidelbeersaft nur noch 33% der zu Beginn der Lagerung enthaltenen Anthocyane nachzuweisen. Nach einjähriger Lagerung waren im Kulturheidelbeersaft nur noch 19%, im Wildheidelbeersaft nur noch 2% der ursprünglichen enthaltenen Anthocyane nachweisbar. Die Heidelbeerkonfitüre zeigte dagegen eine größere Anthocyanstabilität. Während der Verlust an Anthocyanen bei der Konfitürenherstellung im Vergleich zur Rohware rund 40% betrug, wurden nach einer Lagerperiode von 449 Tagen bei Raumtemperatur noch 38% des zu Beginn der Lagerung festgestellten Ausgangswertes gefunden. Durch Kühlagerung konnte der Anthocyanverlust sogar weiter gemindert werden. Nach 449 Tagen waren noch 57% der ursprünglichen Anthocyane nachweisbar. Die Anthocyane in Heidelbeerkonserven zeigten dagegen eine viel geringere Stabilität. Gingen bei der Kochung mehr als 40% verloren, konnten nach einem Lagerzeitraum von 371 Tagen nur noch 12% der ursprünglichen Gehalte nachgewiesen werden. Am stabilsten erwiesen sich gefriergetrocknete und gefrorene, unter Licht- und Sauerstoffausschluss gelagerte Heidelbeerproben. Sowohl bei den gefriergetrockneten als auch bei den gefrorenen Proben blieben nach einer Lagerung von einem Jahr noch 92% der ursprünglich bestimmten Anthocyankonzentrationen erhalten. Hier zeigten sich Parallelen zur hohen Stabilität des Heidelbeerextraktes (FEI). Neben den Stabilitätsuntersuchungen diente die HPLC-Methode auch zur Erfassung der prozessinduzierten Ausbeutesteigerung von phenolischen Inhaltsstoffen der mittels Ultraschall und Hochspannungsimpulsen an der TU Berlin behandelten Heidelbeerproben. So führte der Zellaufschluss durch Behandlung von Heidelbeertrestern mittels dieser Verfahren zu einer Steigerung der Ausbeuten an antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen bei der anschließenden wässrigen und ethanolischen Extraktion. Auch der Vergleich dieser Technologien mit herkömmlichen Verfahren der Maischevorbehandlung zeigte einen erhöhten Übergang von Anthocyanen in die Säfte, welcher sich durch einen erhöhten Zellaufschlussgrad erklären lässt. Während die Hochspannungsimpulsvorbehandlung zu einer Verdoppelung des Anthocyangehaltes in den Presssäften führte, erfolgte durch die Maischeenzymierung fast eine Verdreifachung der Gesamtausbeute, dargestellt in Abb. 3.20 (FEI).

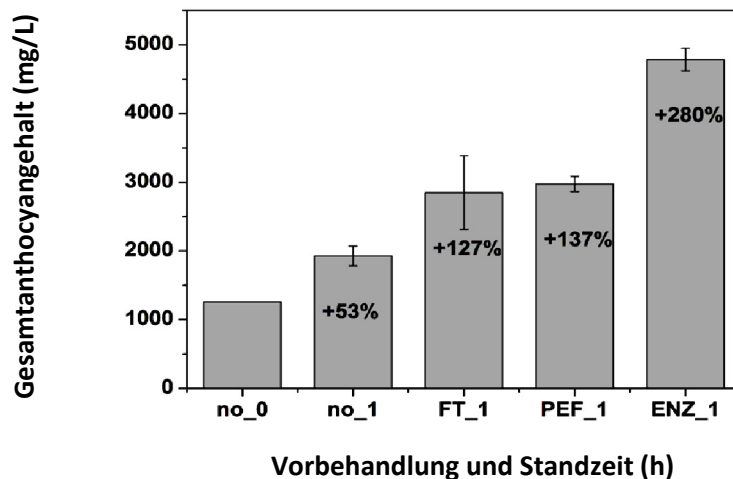


Abb. 3.20: Gesamtanthocyangehalt in den Presssäften aus unterschiedlich vorbehandelten Maischen (ohne Vorbehandlung ,no‘ mit und ohne Standzeit; Gefrier-Tau-Prozess ,FT‘ bei -10°C für 2 x 2 h; Hochspannungsimpulse ,PEF‘ bei 4 kV/cm und 30 kJ/kg; Enzymierung ,ENZ‘, Enzymierungstemperatur 45 °C) nach Jäger und Knorr in FEI .

3.1.4 Charakterisierung und Vergleich von Heidelbeerextrakten

In diesem Arbeitsschritt wurden polyphenolreiche Extrakte aus Saftkonzentrat bzw. frischen Heidelbeeren durch Adsorption an Amberlite® XAD-7 Material hergestellt und mit dem kommerziellen Heidelbeerextrakt verglichen. Für die Gewinnung eines solchen Extraktes aus Saftkonzentrat der Firma Bayernwald wurden 5 L Saftkonzentrat in 50 L H₂O gelöst und mit 5 mL Eisessig angesäuert. Die Adsorption der Polyphenole an Amberlite® XAD-7 Material erfolgte in 2 m hohen und 11 cm dicken Glassäulen, die bis zu einer Höhe von 1,80 m mit dem XAD-7 Material gefüllt waren. Nach Aufgabe der Probe wurde mit 30 L Nanopure® Wasser gewaschen, um restliche Zucker und organische Säuren zu entfernen. Anschließend wurde mit 10 L Methanol/Eisessig im Verhältnis 19:1 (v/v) eluiert. Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer eingengt und gefriergetrocknet. Auf diese Weise wurden drei Ansätze durchgeführt und aus jeweils 5 L Saftkonzentrat einmal 225 g, einmal 208 g und einmal 225 g Extrakt erhalten. Die Analyse des XAD-7-Extraktes mittels HPLC-DAD lieferte kaum nennenswerte Unterschiede des Anthocyanprofiles im Vergleich mit dem kommerziellen Heidelbeerextrakt. Insgesamt enthielt der XAD-7-Extrakt mit einem Gesamtanthocyangehalt von 24,8% geringfügig weniger Anthocyane als der kommerzielle Heidelbeerextrakt (27,6%). Die Abb. 3.21 zeigt den Vergleich der Anthocyanprofile beider Extrakte. Auffallend ist, dass im XAD-7 Extrakt keine Aglykone nachzuweisen waren, während im kommerziellen Extrakt Cyanidin, Petunidin, Peonidin und Malvidin, sowie mittels HPLC-ESI-MS auch Delphinidin, das zusammen mit Petunidin-3-arabinsid koeluiert, nachgewiesen werden konnten. Offensichtlich wurden bei der Herstellung des kommerziellen Heidelbeerextraktes schon einige Anthocyane in die Zuckerbausteine und die entsprechenden Aglykone gespalten, während bei der Herstellung der XAD-7 Extrakte im Labormaßstab, wahrscheinlich durch schonendere Bedingungen, keine Degradation stattgefunden hat.

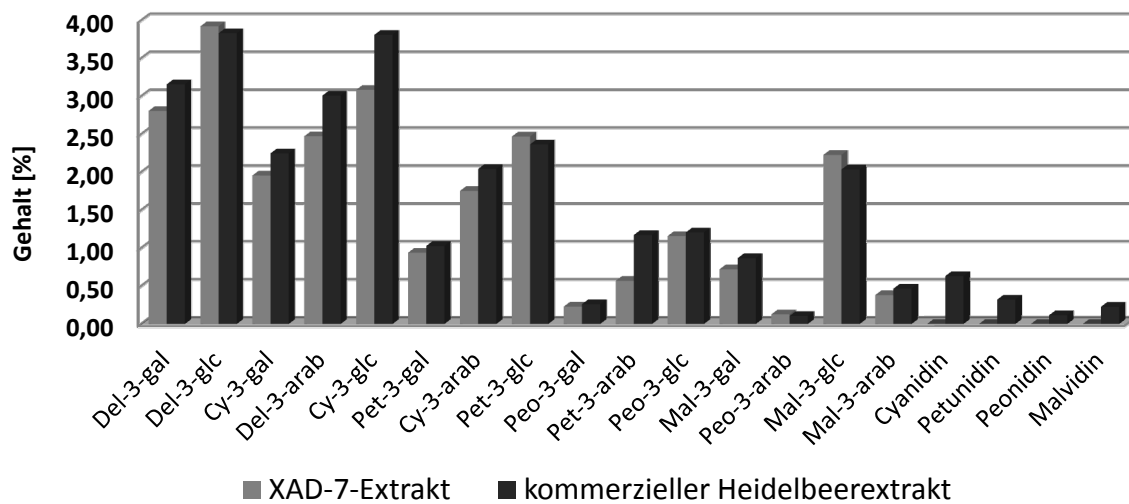


Abb. 3.21: Vergleich der Anthocyanprofile von XAD-7 Extrakt aus Saftkonzentrat und dem Projektextrakt.

Im Labor konnte die säurekatalysierte Hydrolyse in die Zuckerbausteine und Aglykone durch zu lange Standzeiten der Lösungen, durch zu saure Extraktionsmittel, z. B. Verwendung von HCl statt Eisessig und durch Einwirkung zu hoher Temperaturen nachgewiesen werden. Inwieweit einer dieser Faktoren oder die Kombination mehrerer Ursachen für die Degradation bei der Extrakterstellung im Großmaßstab verantwortlich ist, kann nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Sicherlich sind in der industriellen Produktion ähnlich kurze Verweil- und Verarbeitungszeiten wie im Labormaßstab nicht realisierbar. Eine schnelle Anreicherungsmethode mit gleichbleibender dynamischer Bindungskapazität bei hohen Flussraten, sprich eine membran chromatographische Methode, könnte hier eventuell Abhilfe schaffen. Auch aus frischen Heidelbeeren wurde ein XAD-7 Extrakt durch Extraktion mit Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) und anschließender Adsorption an XAD-7 hergestellt. Auch dieser Extrakt enthielt keine Aglykone und war vom Profil und Gesamtanthocyangehalt (25,6%) mit dem Extrakt aus Saftkonzentrat vergleichbar. Aus 1 kg frischen Heidelbeeren wurden 11,3 g Extrakt gewonnen.

3.2 Fraktionierung des Heidelbeerextraktes

3.2.1 Fraktionierung durch Lösungsmittelextraktionen und Fällungen

Zur Klärung möglicher synergistischer Wirkungen zwischen den Polyphenolen der Wildheidelbeere sollte der kommerzielle Heidelbeerextrakt zunächst in die drei Subfraktionen: Anthocyane, Copigmente und polymere Extraktbestandteile getrennt werden. Ein Ansatz dafür war die Trennung dieser Substanzklassen anhand ihrer unterschiedlichen Polaritäten durch Lösungsmittel-Extraktionen und -Fällungen. Das Fließschema dazu zeigt die Abb. 3.22. Aus dem Extrakt wurden die Copigmente nach Kapitel 5.4.7 durch Ausschütteln mit Ethylacetat erhalten. Nach Abtrennung der Copigmente wurden die Anthocyane und die polymeren Extraktbestandteile der resultierenden wässrigen Phase getrennt, indem die polareren polymeren Verbindungen mit Hexan ausgefällt wurden (siehe Kapitel 5.4.8).

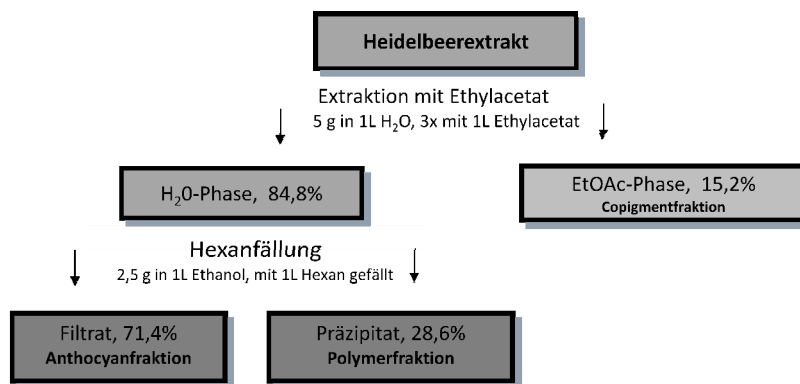


Abb. 3.22: Fließschema zur Fraktionierung des Heidelbeerextraktes durch Lösungsmittel-Extraktionen und Fällungen.

Die Quantifizierung der Inhaltsstoffe der erhaltenen Fraktionen erfolgte mittels HPLC-DAD. Unbekannte Verbindungen der Copigmentfraktion wurden mittels der in Kapitel 3.4 beschriebenen Isolierungsstrategien und Strukturaufklärungsschritte identifiziert. Die Quantifizierung der Inhaltsstoffe in den Fraktionen zeigte eine Anreicherung der Anthocyane, Copigmente und Polymere in den einzelnen Fraktionen, jedoch keine vollständige Trennung der einzelnen Stoffklassen.

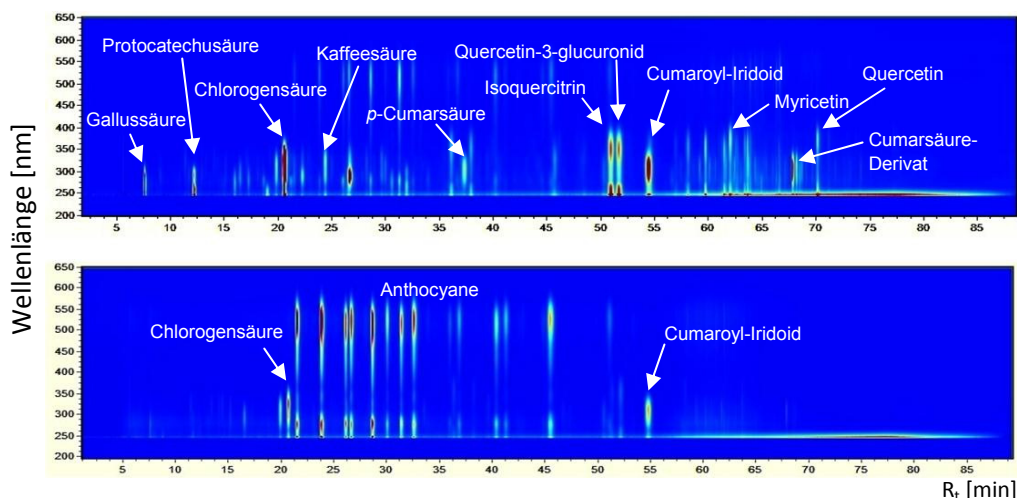


Abb. 3.23: HPLC-DAD-Chromatogramme der nach Lösungsmittel-Extraktion und Fällungen erhaltenen Copigment- und Anthocyanfraktion.

Dies zeigen auch die HPLC-DAD-Chromatogramme der Copigment- und der Anthocyanfraktion in Abb. 3.23. Hier wird deutlich, dass die bei 520 nm adsorbierenden Anthocyane nicht vollständig von den Copigmenten mit Adsorptionsmaxima im Bereich von 250-360 nm getrennt werden können. Auch die Anthocyanfraktion enthält noch Anteile der polaren Copigmente wie Chlorogensäure oder ein im Extrakt enthaltenes Cumaroyl-Iridoid (vergl. Kapitel 3.4). Auch die Abtrennung der polymeren Bestandteile des Extraktes durch die Hexanfällung gelang nicht zufriedenstellend, denn die Polymerfraktion enthielt noch einen beträchtlichen Anteil an Anthocyanen. Eine fraktionierte Fällung durch die portionsweise Zugabe von Hexan während der Fällung zeigte, dass es nicht möglich ist, die Polymere vollständig auszufällen, ohne dass bereits auch ein Teil der Anthocyane mit ausgefällt wird. Neben den sehr polaren abtrennbaren polymeren Verbindungen gibt es im Extrakt offensichtlich polymere Bestandteile, die erst dann präzipitieren, wenn bereits Anthocyane mit ausfallen. Deshalb wurde das optimale Verhältnis bestimmt, bei dem ein möglichst großer Anteil polymerer Verbindungen erfasst wird, jedoch möglichst wenig Anthocyane ausfallen. Dieses optimale Verhältnis lag im Falle des Heidelbeerextraktes bei 1:1 (v/v) zwischen Ethanol und Hexan. Die Tab. 3.3 zeigt die in den einzelnen Fraktionen quantifizierten Verbindungen. Es konnte gezeigt werden, dass der Anthocyangehalt des Extraktes durch die Lösungsmittlextraktion und die anschließende Hexanfällung von 27,6% auf maximal 42,3% (Anthocyanfraktion) gesteigert werden kann. Höhere Anthocyangehalte können aufgrund des noch großen Anteils an polymeren Verbindungen und auch Copigmenten in dieser Fraktion nicht realisiert werden.

Tab. 3.3: Polyphenolgehalte in den durch Lösungsmittel-Extraktion und Fällungen erhaltenen Subfraktionen des Heidelbeerextraktes

[%]	Verbindung	Extrakt	Ethylacetatphase Copigmente	H ₂ O-Phase	Präzipitat Polymere	Filtrat Anthocyane
Anthocyangehalt¹ Gesamt		27,62	3,35	30,09	22,08	41,63
Aglykone¹	Delphinidin	nm	2,12	nd	nd	nd
	Cyanidin	nm	2,02	nd	nd	nd
	Petunidin	0,09	0,92	nd	nd	nd
	Peonidin	0,03	0,33	nd	nd	nd
	Malvidin	0,06	0,74	nd	nd	nd
Chlorogensäure		1,10	7,36	0,37	0,13	0,57
Flavonole²	Quercetin	0,28	2,44	nd	nd	0,01
	Quercetin-Galactosid	0,34	2,25	0,08	0,01	0,15
	Quercetin-Glucuronid	0,41	2,23	0,17	0,00	0,30
	Quercetin-Arabinosid	0,12	0,68	0,01	0,00	0,01
	Quercetin-Rhamnosid	0,12	0,64	0,02	0,01	0,02
	Myricetin	0,15	1,03	0,01	0,00	0,01
Phenolcarbonsäuren³	Gallussäure	0,15	0,92	0,03	0,04	0,03
	Protocatechusäure	0,21	1,49	0,03	0,02	0,04
	5-Hydroxyvanillinsäure	0,05	0,39	0,02	0,02	0,01
	Vanillinsäure	nm	0,51	nm	nm	nm
	Syringasäure	nm	0,06	nm	nm	nm
Hydroxyzimtsäuren³	Kaffeesäure	nm	0,28	nm	nm	nm
	p-Cumarsäure	nm	1,08	nm	nm	nm
sonstige³	Depsid	0,01	0,31	0,02	0,02	0,03
	Cumaroyl-Iridoid	0,13	0,33	0,11	nd	0,18
	Cumarsäure-Derivat	0,05	0,26	0,02	nd	0,02

Quantifizierung erfolgte als: ¹Cyanidin-3-glucosid-Äquivalente [520 nm]; ²Quercetin-3-glucosid-Äquivalente [351 nm]; ³Gallussäure-Äquivalente [280 nm], nd = nicht detektiert, nm = nicht möglich wegen Koelution mit Anthocyanen

Die Polymerfraktion besitzt durch das Mitfällen von Anthocyanen noch einen beträchtlichen Gesamtanthocyangehalt von 22,08%. Auch in der Copigmentfraktion kann noch ein Anthocyangehalt von 3,35% nachgewiesen werden. Die aufgrund des fehlenden Zuckerrestes lipophileren Aglykone der Anthocyane aus dem kommerziellen Extrakt sind ebenfalls noch in der Copigmentfraktion nachzuweisen. Zusammenfassend bietet die Lösungsmittelfraktionierung zwar eine Möglichkeit, die phenolischen Komponenten aufgrund ihrer verschiedenen Polaritäten in einzelnen Fraktionen anzureichern, eine vollständige Trennung der Stoffklassen ist jedoch mit dieser Methode nicht möglich. Deshalb war es notwendig, weitere Möglichkeiten zur vollständigen Fraktionierung des Extraktes zu entwickeln.

3.2.2 Fraktionierung des Heidelbeerextraktes mittels HSCCC

Die angestrebte vollständige Trennung der drei Substanzklassen wurde mittels der Gegenstromverteilungschromatographie im Rahmen der Entwicklung einer HSCCC-Methode zur Trennung von Heidelbeerextrakten realisiert. Die Parameter zur Durchführung dieser HSCCC-Trennung finden sich im Material und Methodenteil im Kapitel 5.4.1. Das in Abb. 3.24 dargestellte HSCCC-Chromatogramm zeigt die Trennung von 525 mg des kommerziellen Heidelbeerextraktes mit dem Fließmittelsystem TBME/n-BuOH/MeCN/H₂O im Verhältnis 1:3:1:5 (v/v/v/v) + 0,1% TFA. Nach 2,5 Stunden erfolgt der Durchbruch der mobilen Phase. Hierbei eluieren aufgrund des Trennprinzips (vergl. Kapitel 2.3.3), sowie unter Verwendung der lipophileren Phase als stationäre Phase des Fließmittelsystems, zunächst die polaren Bestandteile des Extraktes. Das sind zunächst polymere gut wasserlösliche Verbindungen, die sich in der Durchbruchfraktion I sowie in Fraktion II wiederfinden. Im Folgenden eluieren die Anthocyane (Fraktionen III-VIII), während die unpolareren Phenolsäuren und Flavonole als Copigmentfraktion in der stationären Phase auf dem Coil-System zurückbleiben.

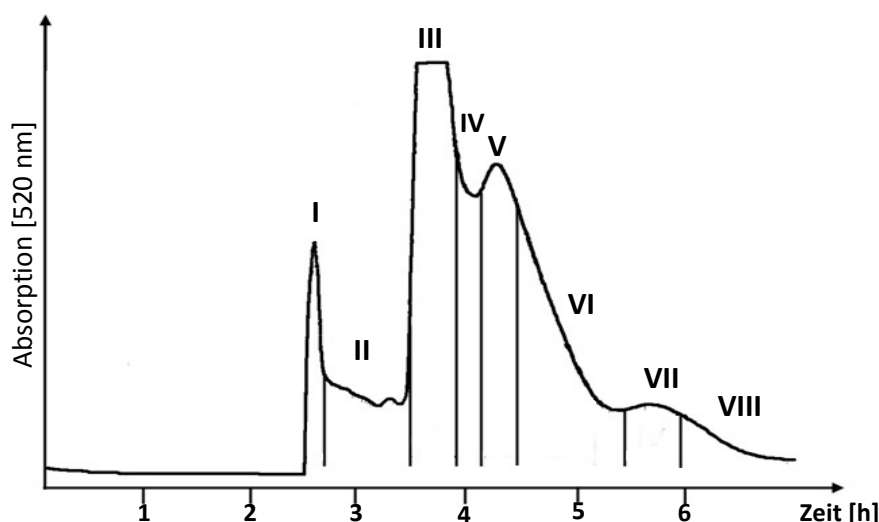


Abb. 3.24: HSCCC-Chromatogramm der Trennung von 525 mg Heidelbeerextrakt mit dem Fließmittelsystem TBME/n-BuOH/MeCN/H₂O im Verhältnis 1:3:1:5 (v/v/v/v) + 0,1% TFA.

Die Abb. 3.25 zeigt einige HPLC-DAD-Chromatogramme der erhaltenen HSCCC-Fractionen im Vergleich mit dem für diese Trennung eingesetzten Heidelbeerextrakt. Deutlich wird die saubere Trennung der bei 520 nm absorbierenden Anthocyane von den restlichen Copigmenten mit Absorptionsmaxima um 280 bis 360 nm. Die Charakterisierung der Copigmentfraktion und der darin enthaltenen Verbindungen erfolgt in Kapitel 3.4.1.

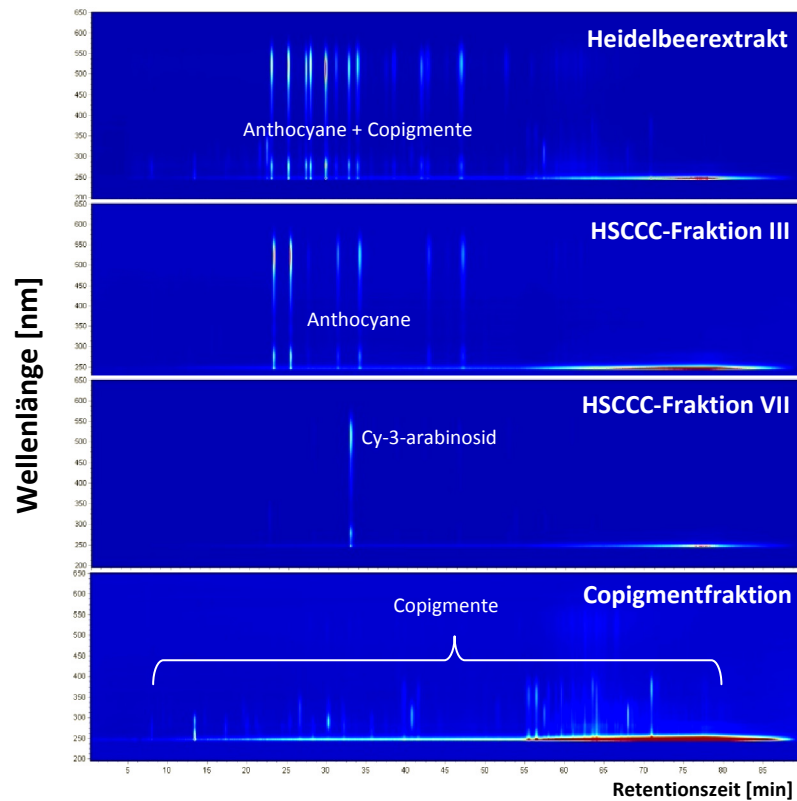


Abb. 3.25: Vergleich des HPLC-DAD-Chromatogrammes des Heidelbeerextraktes mit einigen aus seiner Trennung erhaltenen ausgewählten HSCCC-Fraktionen.

Die Tab. 3.4 zeigt einen Überblick über die erhaltenen HSCCC-Fraktionen. Durch die Trennung mittels HSCCC konnten aus dem Heidelbeerextrakt zwei Polymerfraktionen mit Massenanteilen von 16,0% bzw. 16,9% bezogen auf den Gesamtextrakt erhalten werden. Der Extrakt enthält demzufolge ca. 33% Polymere bzw. andere sehr polare Bestandteile. Mit den Fraktionen III bis VIII konnten die Anthocyane aus dem Extrakt isoliert und von den Polymeren und Copigmenten abgetrennt werden. Insgesamt machten die Anthocyan-Fraktionen einen Gesamtanteil von 46,4% der eingewogenen Extraktmenge aus. Die Copigmentfraktion zeigte einen Massenanteil von 19,5% am Gesamtextrakt. Damit konnten bei der Trennung 98,8% der eingesetzten Extraktmenge zurückgewonnen werden.

Tab. 3.4: Überblick über die erhaltenen HSCCC-Fraktionen der Trennung des Heidelbeerextraktes

Fraktion	Auswaage [mg]	Massenanteil [%]	Verbindungen
FI	84,0	16,0	Polymere
FII	89,0	16,9	Polymere
FIII	86,2	16,4	Del-3-gal, Del-3-glc, Pet-3-gal, Pet-3-glc, Mal-3-gal, Mal-3-glc
FIV	24,1	4,6	alle Anthocyane aus FIII & FV
FV	37,6	7,2	Cy-3-gal, Cy-3-glc, Del-3-arab, Pet-3-glc, Pet-3-arab, Peo-3-gal, Peo-3-glc, Peo-3-arab, Mal-3-arab
FVI	54,9	10,5	alle Anthocyane aus FV & VII
FVII	17,5	3,3	Cy-3-arab
FVIII	23,2	4,4	Cy-3-arab
Coilrückstand	102,5	19,5	Copigmentfraktion

Die Trennung macht deutlich, dass es zwar aufgrund der Vielzahl von Anthocyanen mit sehr ähnlichen Polaritäten nicht möglich ist, diese einzeln aus dem Heidelbeerextrakt zu isolieren, jedoch

können die Anthocyane ähnlicher Polaritäten in den Fraktionen angereichert und von den Polymeren und Copigmenten sehr gut abgetrennt werden. Außerdem ermöglicht die HSCCC, den Extrakt in die gewünschten drei Fraktionen der Polymere, Anthocyane und Copigmente zu trennen. Ein Scale-Up dieser Methode in Form einer Trennung mittels LSRCCC, zur Trennung und Aufreinigung größerer Probenmengen von bis zu 20 g, findet sich im Kapitel 3.3. Hier wurde die LSRCCC genutzt, um größere Mengen der Polymerfraktion zu isolieren und das durchschnittliche Molekulargewicht dieser Fraktion mittels Feld-Fluss-Fraktionierung zu bestimmen. Alle gegenstromverteilungschromatographischen Trenntechniken haben allerdings, sofern es sich um Trennungen von Anthocyanen handelt, einen entscheidenden Nachteil. Damit die Trennung funktioniert, ist der Zusatz von Trifluoressigsäure (TFA) im Fließmittelsystem zwingend erforderlich. TFA fungiert als starkes Ionenpaarbildungsreagenz mit den positiv geladenen Flavylumkationen und setzt dadurch die Polarität der Anthocyane in dem Fließmittelsystem herab. Nur dadurch wird eine Verteilung der Anthocyane in beiden Phasen des Fließmittelsystems erreicht und eine Trennung von den übrigen Extraktbestandteilen gewährleistet. Der Nachteil besteht darin, dass sämtliche Fraktionen nach dem Gefriertrocknen noch TFA Rückstände beinhalten können. TFA kann zwar prinzipiell durch Zugabe von Salzsäure entfernt werden, für Proben, die für biologische Studien eingesetzt werden sollen, sind dennoch alternative (TFA-freie) Aufbereitungsmethoden wünschenswert, für den Einsatz der Anthocyane in Lebensmitteln und Functional Food sogar zwingend erforderlich. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit eine alternative Methode zur Fraktionierung des Extraktes mittels Membranchromatographie entwickelt, siehe Kapitel 3.5.

3.2.2.1 Untersuchung der antioxidativen Aktivität der Extraktfraktionen

Zwar eignet sich die im vorherigen Kapitel gezeigte HSCCC-Methode nicht, um Fraktionen für biologische Testungen zu erhalten, für die Gewinnung von Fraktionen, bei welchen TFA-Rückstände keinen Einfluss auf das Ergebnis haben, wie zum Beispiel die photometrische Bestimmung der antioxidativen Aktivität mittels TEAC-Assay, oder die Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu, ist die HSCCC aber durchaus geeignet. Abb. 3.26 zeigt die ermittelten antioxidativen Aktivitäten und die Gesamtpolyphenolgehalte der HSCCC-Fractionen aus dem Heidelbeerextrakt.

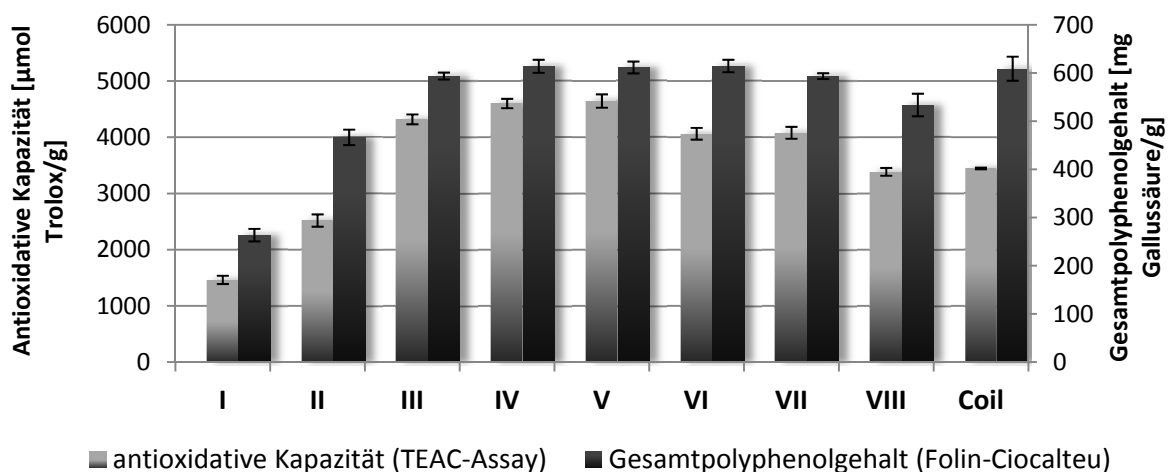


Abb. 3.26: Antioxidative Aktivität und Gesamtpolyphenolgehalt der HSCCC-Fractionen. I und II (Polymerfraktionen), III, IV, V, VI, VII, VIII (Anthocyanfraktionen) und Coilfraktion (Copigmente).

Es wird deutlich, dass die Fraktionen III-V, in denen die Anthocyane in einem besonders hohen Grad angereichert werden konnten, auch die höchsten antioxidativen Aktivitäten (4500 μmol Trolox/g) im TEAC-Test zeigen. Die Coilfraktion mit den Copigmenten des Extraktes zeigt dagegen zwar einen ähnlich hohen Wert bei der Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes ($> 600 \text{ mg/g}$), jedoch im TEAC-Test mit 3500 μmol Trolox/g eine geringere antioxidative Aktivität als die Heidelbeeranthocyane. Die Fraktionen I und II, in denen die polaren Extraktbestandteile einschließlich der Polymere angereichert wurden, weisen dagegen deutlich geringere antioxidative Aktivitäten auf.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Anthocyane den größten Beitrag zur hohen antioxidativen Aktivität des Gesamtextraktes liefern. Die Gewinnung von Extraktfraktionen für Bio-Assays ohne TFA-Rückstände und ein Vergleich der antioxidativen Aktivitäten dieser mittels Membranchromatographie erhaltenen Fraktionen wird in Kapitel 3.5.3.2 beschrieben.

3.3 Isolierung einer Polymerfraktion mittels LSRCCC

In Kapitel 3.2.2 wurde die erfolgreiche Fraktionierung eines Heidelbeerextraktes in eine Polymer-, eine Anthocyan- und eine Copigmentfraktion mittels HSCCC gezeigt. Auch zur Trennung größerer Extraktmengen, die über die für HSCCC-Trennungen üblichen Mengen von 1 g hinausgehen, lässt sich die Gegenstromverteilungschromatographie nutzen. Dabei bedient man sich der Low-Speed Rotary Countercurrent Chromatography (LSRCCC). Die theoretischen Grundlagen zu dieser Trenntechnik finden sich im Kapitel 2.3.3.2. Hinweise zur Durchführung finden sich im Material und Methodenteil in Kapitel 5.4.2. Die Abb. 3.27 zeigt das Chromatogramm der LSRCCC-Trennung von 25 g Heidelbeerextrakt sowie die Auswaagen der nach Gefriertrocknung erhaltenen Fraktionen.

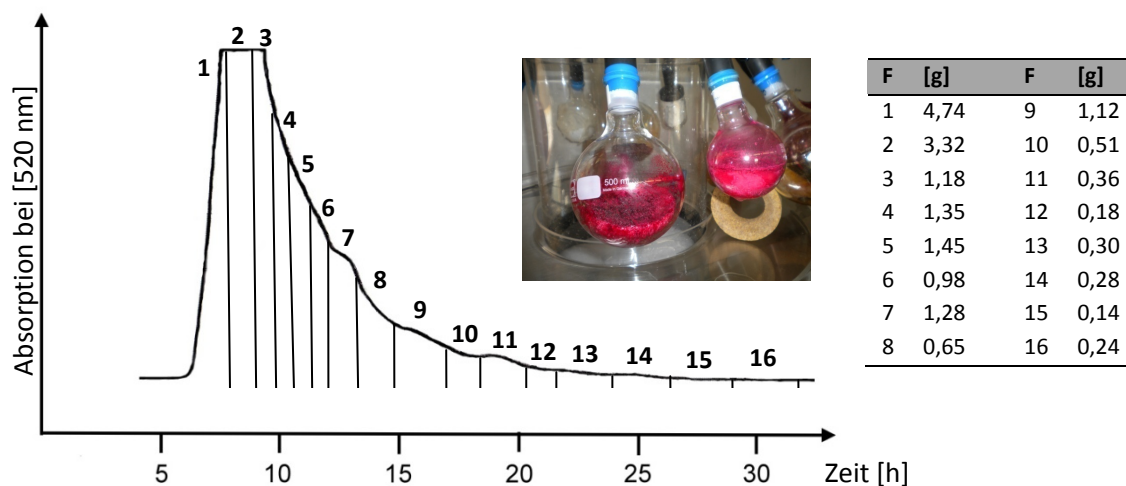


Abb. 3.27: LSRCCC-Chromatogramm der Trennung von 25 g Heidelbeerextrakt und Übersicht über die Auswaagen der erhaltenen gefriergetrockneten Fraktionen (F).

In Übereinstimmung mit der HSCCC-Methode wurde für diese Trennung das sehr polare Fließmittelsystem TBME/n-BuOH/Acetonitril/H₂O im Verhältnis 1:3:1:5 (v/v/v/v), mit einem Zusatz von 0,1% TFA, verwendet. Getrennt wurde im L-I-T-Modus, bei welchem die schwere Phase als mobile Phase vom Tail zum Head des Coils und von innen nach außen gepumpt wird. Bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 65 U/min und einem Fluss von 5 mL/min dauerte die Trennung 35 h.

Zwar eignet sich die Methode nicht zur vollständigen Trennung der Polymer-, Anthocyan- und Copigmentfraktion, jedoch konnten mittels der LSRCCC gegenüber der HSCCC viel größere Extraktmengen getrennt und einzelne Inhaltsstoffgruppen und Zielverbindungen in den Fraktionen stark angereichert werden. Dies verdeutlichen die in Abb. 3.28 gezeigten HPLC-DAD-Chromatogramme einiger der erhaltenen LSRCCC-Fraktionen.

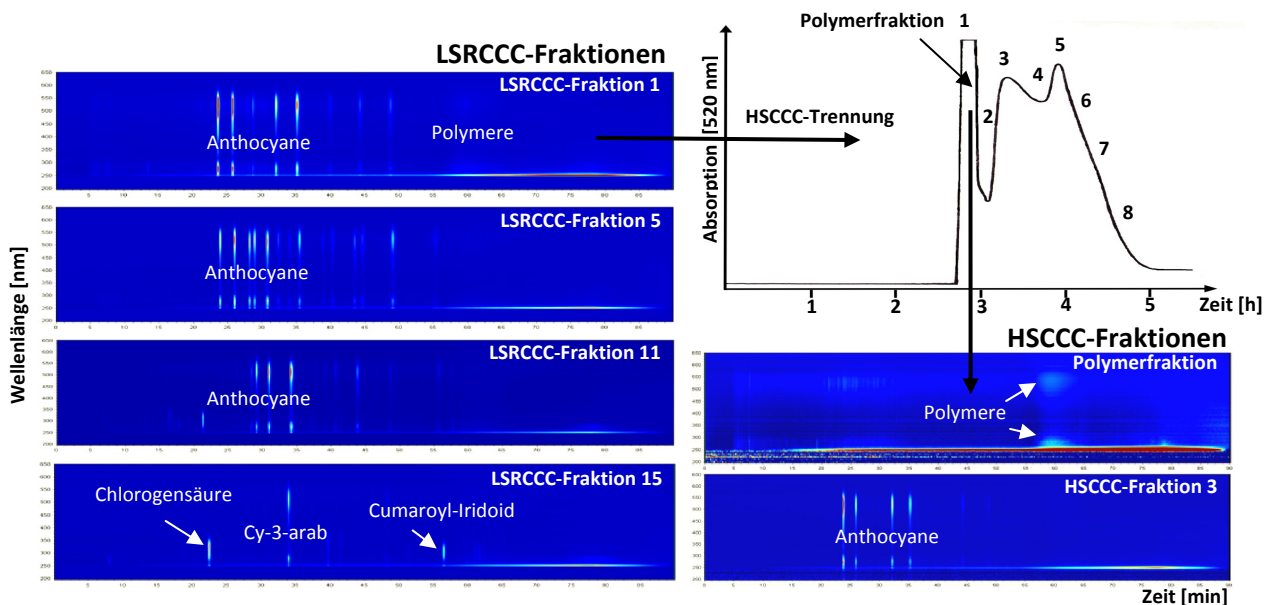


Abb. 3.28: HPLC-DAD-Chromatogramme ausgesuchter LSRCCC- und HSCCC-Fraktionen aus Heidelbeereextrakt sowie das Chromatogramm der HSCCC-Trennung zur Isolierung einer Polymerfraktion aus der LSRCCC-Fraktion 1.

Es wird deutlich, dass die einzelnen Anthocyane aufgrund ihrer ähnlichen Polaritäten, wie auch schon bei der Trennung mittels HSCCC, nicht voneinander getrennt werden konnten. Fraktion 5 beinhaltet z. B. das komplette Anthocyanprofil der Heidelbeere, jedoch sind in dieser Fraktion keine Copigmente oder Polymere mehr zu detektieren. Es konnten somit in dieser Fraktion die Anthocyane der Heidelbeere zwar nicht getrennt, aber zusammen angereichert und vollständig von den Copigmenten und Polymeren des Extraktes abgetrennt werden. In den ersten Fraktionen konnten dagegen hauptsächlich die Anthocyan-Glykoside mit drei Substituenten am B-Ring der Aglykone, wie Delphinidin, Petunidin und Malvidin, angereichert werden. Die späteren Fraktionen, beispielsweise Fraktion 11, beinhalteten Cyanidin- und Peonidin-Glykoside, mit jeweils zwei Substituenten am B-Ring der Aglykone. In den letzten Fraktionen, z. B. in Fraktion 15, konnten die polareren Copigmente, wie die Chlorogensäure und ein in der Copigmentfraktion identifiziertes Cumaroyl-Iridoid (vergleiche Kapitel 3.4) angereichert werden, während die ebenfalls in Kapitel 3.4 identifizierten unpolaren Copigmente des Extraktes auf dem Coil zurückblieben. Hauptsächlich diente die durchgeführte LSRCCC-Trennung jedoch zur Anreicherung einer Polymerfraktion. Zwar konnten die Polymere nicht vollständig von den Anthocyanen getrennt werden, es gelang allerdings eine Anreicherung in der Durchbruchfraktion 1 der LSRCCC-Trennung. Anschließend wurde diese Fraktion durch eine weitere Trennung mittels HSCCC fraktioniert und so eine anthocyanfreie Polymerfraktion erhalten. Das HSCCC-Chromatogramm dieser Trennung sowie das HPLC-DAD-Chromatogramm der erhaltenen Polymerfraktion zeigt ebenfalls die Abb. 3.28. Aus 1,5 g der LSRCCC-Fraktion 1 wurden durch diese Trennung mit dem bekannten Fließmittelsystem aus TBME/n-BuOH/ACN/Wasser 1:3:1:5 (v/v/v/v) +

0,1% TFA (Vergleiche HSCCC-Trennung Kapitel 3.2.2) 680 mg der anthocyan- und copigmentfreien Polymerfraktion erhalten.

Die isolierte Polymerfraktion wurde anschließend in Kooperation mit dem Teilprojekt 6 des Clustervorhabens „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“ mittels der Asymmetrischen Fluss-Feldfluss-Fraktionierung (A4F) und einem MALLS-Detektor (multi angle laser light scattering detector) analysiert. Der zentrale Teil des Gerätes ist ein Trennkanal, in welchem die Trennung der Probe nach Partikel- oder Molekülgröße bzw. ihrem Molekulargewicht erfolgt. Die A4F ist wie die CCC eine chromatographische Methode, bei der es, bedingt durch das Fehlen einer stationären Phase, keine adsorptiven Effekte gibt. Während der Trennkanal an der Oberseite undurchlässig ist, besitzt er an der Unterseite eine für das Fließmittelsystem durchlässige Membran. Dadurch kommt es zu einem passiven Querfluss durch die untere Membran, weshalb die Methode als asymmetrische Fluss-Feldfluss-Fraktionierung bezeichnet wird. Der Querfluss sorgt insbesondere für eine Bewegung der größeren Partikel in die Nähe der Membran, während kleinere Partikel stärker in den Kanal zurückdiffundieren (siehe Abb. 3.29).

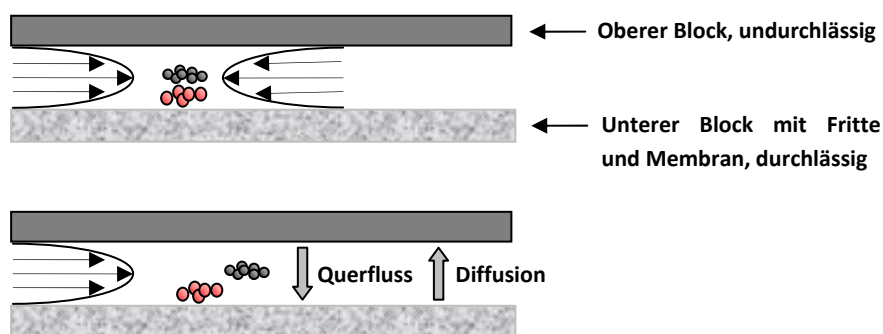


Abb. 3.29: Anordnung von Partikeln unterschiedlicher Größe während der Fokussierung (oben) und der anschließenden Trennung (unten) durch die asymmetrische Fluss-Feldfluss-Fraktionierung.

Durch die unterschiedlichen Strömungsgeschwindigkeiten im Trennkanal, mit abnehmender Tendenz in Membrannähe, kommt es zu einer schnelleren Elution der kleineren Partikel, während die größeren Partikel längere Verweilzeiten in dem Kanal besitzen. Theoretisch kann über die Verweilzeit mit Hilfe des Diffusionskoeffizienten die Größe der Partikel berechnet werden, allerdings ist diese Beziehung in der Praxis nicht immer gegeben. Deshalb erfolgt die Größenbestimmung mittels eines Streulichtdetektors, der die Streuintensität des durch einen Laser eingestrahlichten Lichtes über 18 verschiedene Winkel registriert. Zusätzlich wird mittels eines Brechungsindex (RI)-Detektors die Konzentration der Probe bestimmt. Aus diesen Messungen ist es möglich, die Partikelgröße bzw. das Molekulargewicht zu bestimmen. Für die Auftrennung der Polymerfraktion aus Heidelbeerextrakt wurde ein Trennkanal mit Distanzscheibe (Eclipse-A4F-Trennsystem, Wyatt Technology Europe, Dernbach) mit einer Cellulosemembran (Vortrennung 10 kDa, Microdyn-Nadir, Wiesbaden) verwendet. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde ein 18-Mehrwinkellichtstreuendetektor (MALLS) „Dawn EOS“ (Wyatt Technology Europe, Dernbach) bei der Wellenlänge 690 nm und ein RI-Detektor RI-101 (Showa Denko Europe GmbH, München) sowie zur Berechnung die Astra-Software 4.90 (Wyatt Technology Europe, Dernbach) genutzt. Es wurde ein mittleres Molekulargewicht (M_w) von 68 kDa für die Polymerfraktion aus der Heidelbeere festgestellt (FEI).

3.4 Fraktionierung der Copigmentfraktion sowie Isolierung und Strukturaufklärung unbekannter Verbindungen

Neben den im Heidelbeerextrakt enthaltenen Anthocyanen zeigt auch die Copigmentfraktion im TEAC-Test eine hohe antioxidative Aktivität und ist deshalb nicht minder interessant im Hinblick auf die Identifizierung ihrer bioaktiven phenolischen Inhaltsstoffe. Nach dem Erhalt der Copigmentfraktion durch Extraktion (siehe Kapitel 3.2.1), HSCCC (siehe Kapitel 3.2.2) oder Membranchromatographie (siehe Kapitel 3.5.3), bedarf es allerdings einer weiteren Auftrennung mittels HSCCC, um einzelne Verbindungen aus der sehr komplex zusammengesetzten Copigmentfraktion anzureichern, bevor diese mittels HPLC-DAD-ESI-MS bzw. nach Isolierung auch mittels NMR-Spektroskopie identifiziert werden können.

3.4.1 HSCCC-Trennung der Copigmentfraktion

Um die Inhaltsstoffe der Copigmentfraktion des Heidelbeerextraktes zu charakterisieren, wurden 625 mg der durch Extraktion mit Ethylacetat erhaltenen Copigmentfraktion (siehe Kapitel 3.2.1) mittels High-Speed Countercurrent Chromatography getrennt.

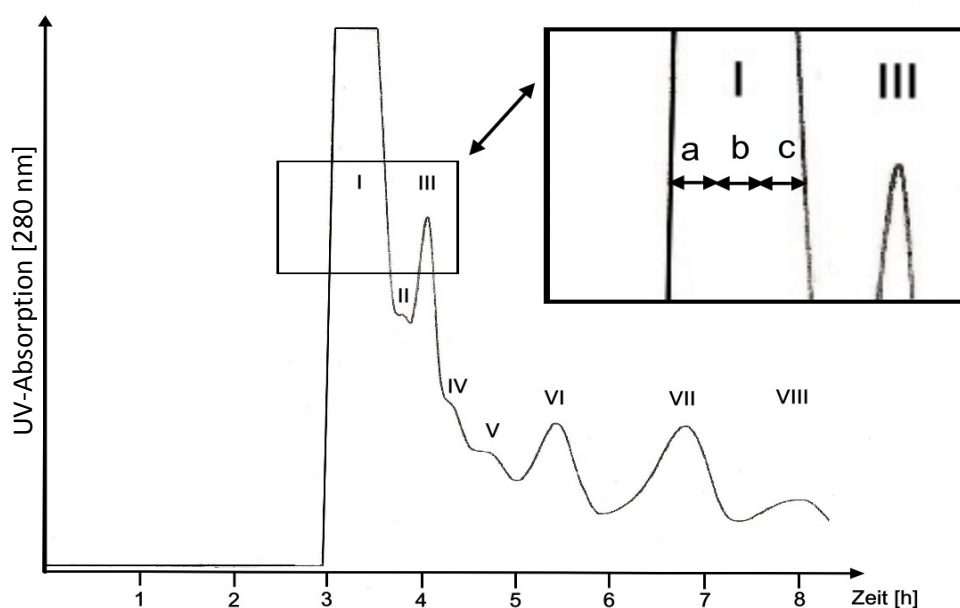


Abb. 3.30: HSCCC-Chromatogramm der Trennung von 625 mg der Copigmentfraktion aus Heidelbeerextrakt. Fließmittelsystem: Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser im Verhältnis 1:5:1:5 (v/v/v/v).

Die Parameter für die Durchführung dieser Trennung finden sich im Material und Methodenteil unter 5.4.1. Verwendet wurde ein Fließmittelsystem aus Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser im Verhältnis 1:5:1:5 (v/v/v/v). Abb. 3.30 zeigt das Chromatogramm der Trennung bei einer Absorptionswellenlänge von 280 nm. Mit der Durchbruchfraktion eluieren nach 3 Std. zuerst die polareren, gefolgt von zunehmend unpolaren, aufgrund ihrer größeren Verteilungskoeffizienten in der lipophilen stationären Phase besser löslichen Verbindungen. Die Durchbruchfraktion I wurde aufgrund der Zusammensetzung in drei weitere Unterfraktionen Ia, Ib und Ic unterteilt. Diese ersten drei Fraktionen enthalten allesamt Anthocyane sowie polymere Verbindungen, die bei der

Gewinnung der Copigmentfraktion durch Extraktion nicht vollständig eliminiert werden konnten und aufgrund ihrer hohen Polarität mit dem Durchbruch eluierten. Tab. 3.5 zeigt die Auswaagen der nach Gefriertrocknung erhaltenen HSCCC-Fractionen.

Tab. 3.5: Ausbeuten nach Gefriertrocknung der Copigment-HSCCC-Fractionen

Fraktion	Ia	Ib	Ic	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	Coil
[mg]	165	50	20	6,5	22	14	15	15	21	9	57

Abb. 3.31 zeigt die mittels TEAC-Assay ermittelten antioxidativen Aktivitäten und die nach Folin-Ciocalteu ermittelten Gesamtpolyphenolgehalte dieser Fractionen. Der Vergleich von antioxidativer Aktivität und Gesamtpolyphenolgehalt zeigt eine überdurchschnittliche Aktivität der Fractionen II und III. Hier handelt es sich um sehr aktive Verbindungen, die einen sehr großen Beitrag zur antioxidativen Aktivität der Copigmentfraktion leisten.

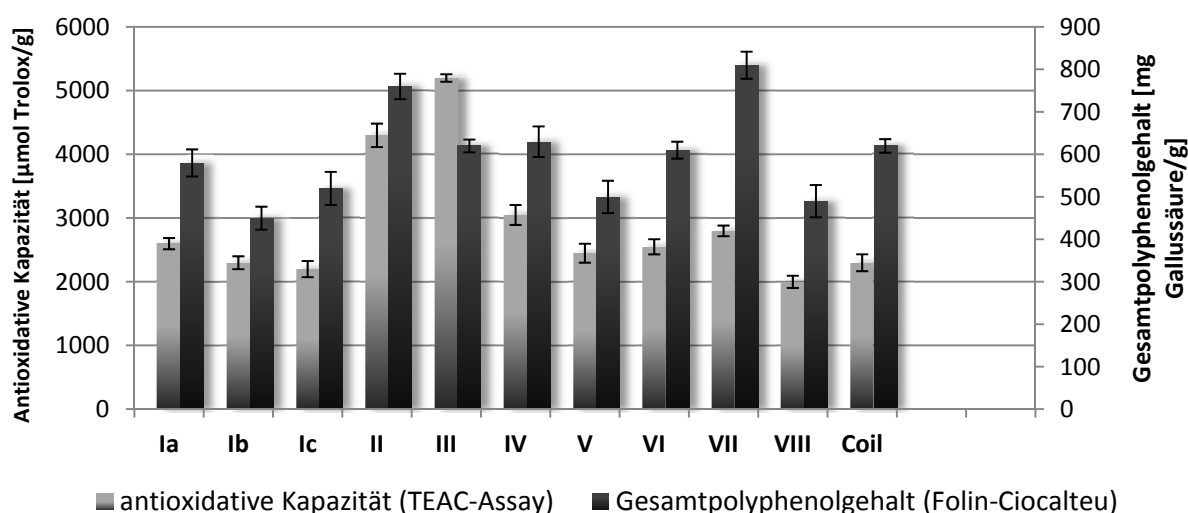


Abb. 3.31: Antioxidative Aktivitäten und Gesamtpolyphenolgehalte der HSCCC-Fractionen aus der Trennung der Heidelbeer-Copigmente.

Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte mittels HPLC-DAD-ESI-MS Analytik der Fractionen. Einen Überblick über die in den Fractionen angereicherten Copigmente zeigt die Tab. 3.6. Die Zuordnung erfolgte, soweit möglich, aufgrund der Retentionszeiten von Standardsubstanzen sowie der Fragmentierung in den durchgeführten HPLC-ESI-MS Messungen und der mittels HPLC-DAD erhaltenen UV/Vis-Spektren. Aufgrund der sehr geringen Ausbeuten und der teilweise noch recht komplexen Zusammensetzung der HSCCC-Fractionen wurden unbekannte Minorverbindungen, zu denen keine Standards verfügbar waren, mittels einer LSRCCC-Trennung aus der Copigmentfraktion angereichert und nach Isolierung mittels NMR-Spektroskopie strukturell aufgeklärt (siehe Kapitel 3.4.2). Bei einigen Minorverbindungen erlaubten die geringen Gehalte jedoch keine Isolierung, so dass zur Identifizierung nur die Daten der HPLC-DAD-MS Messungen herangezogen werden konnten.

In den Durchbruchsfractionen Ia - Ic konnten neben Anthocyanen und Polymeren vor allem Flavonol-Glykoside wie Myricetin-3-galactosid und -glucosid (Fraktion Ia) sowie Quercetin-3-galactosid und -Glucosid (Fraktion Ib und Ic) angereichert werden. In Fraktion Ia wurden außerdem zwei Cumaroyl-Iridoid-Isomere entdeckt, von denen das Isomer 1 (10-*p-trans*-Cumaroyl-1S-Monotropen), aufgrund

seines deutlich höheren Gehaltes mittels LSRCCC angereichert, isoliert und strukturell aufgeklärt werden konnte (siehe Kapitel 3.4.2). Das zweite Isomer, ein Kaffeesäure-Derivat und ein Proanthocyanidin-Dimer waren nur in Spuren vorhanden und konnten nicht aus der Copigmentfraktion isoliert werden, so dass die vorgeschlagenen Strukturen auf den Daten der HPLC-DAD-MS-Messungen beruhen. In der Fraktion Ib konnten außer den genannten Quercetin-Glykosiden zusätzlich Quercetin-3-glucuronid, Gallocatechin und Epigallocatechin sowie Chlorogensäure (5-CQA) identifiziert werden. Weiterhin konnte in dieser Fraktion, sowie in Fraktion Ic, in der ebenfalls sämtliche genannten Quercetinderivate nachgewiesen werden konnten, auch das Cumarsäure-Derivat (2*S*,4*R*)-4-(β -D-Glucopyranosyloxy)-pentan-2-yl-(2*E*)-*p*-cumarat) angereichert und später auch mittels LSRCCC isoliert und mittels NMR-Spektroskopie identifiziert werden.

Tab. 3.6: Übersicht über die mittels HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS bestimmten charakteristischen Daten der in den HSCCC-Fractionen angereicherten Hauptverbindungen.

Nr.	Verbindung	λ_{\max} [nm]	ESI-MS (negativer Modus)		R _t [min]	Fraktion
			[M-H] ⁻	Fragmente [m/z]		
1	Myricetin-Galactosid	351, 295	479	316	40,44	Ia
2	Myricetin-Glucosid	351, 295	479	316	42,33	Ia
3	Kaffeesäure-Derivat **	315, 295	341	179, 135	21,12	Ia
4	Proanthocyanidin Dimer **	279	577	559, 451, 425, 407, 289	24,40	Ia
5	Cumaroyl-Iridoid Isomer 1*	311, 295	535	491, 371, 329, 311, 191, 163	57,71	Ia
6	Cumaroyl-Iridoid Isomer 2**	311, 295	535	491, 371, 329, 311, 191, 163	58,52	Ia
7	Gallocatechin	271	305	261, 219, 179, 165, 139, 137	8,39	Ib
8	Epigallocatechin	271	305	261, 219, 179, 165, 139, 137	14,87	Ib
9	Chlorogensäure (5-CQA)	299, 327	353	191	22,97	Ib
10	Quercetin-Glucuronid	351, 259	477	301	57,45	Ib, Ic
11	Quercetin-Galactosid	351, 259	463	301	55,91	Ib, Ic
12	Quercetin-Glucosid	351, 259	463	301	56,71	Ib, Ic
13	Cumarsäure-Derivat *	311, 295	411	(249), 163, 145, 119	68,11	Ib, Ic
14	Feruloyl-Chinasäure (5-FQA)	323, 295	367	193, 191, 173	51,40	Ic
15	Depsid 1*	279	335	183, 169, 165, 139	20,20	II, III
16	Cumaroyl-Chinasäure (5-pCuQA)	311, 291	337	191, 163	32,39	II
17	Gallussäure	271	169	125	8,03	III, IV
18	Epicatechin	279	289	245, 179, 125	28,48	III, IV
19	Catechin	279	289	245, 179, 125	14,05	IV
20	Delphinidin	527, 275	301		40,31	IV, V
21	Caffeoyl-Shikimisäure	327, 295	335	179, 161, 135	32,30	V
22	Quercetin-Arabinosid	351, 295	433	301	61,52	V, VI
23	5-Hydroxy-Vanillinsäure	275	183	168, 139, 124	17,23	VI
24	Depsid 2**	295, 267	319	183, 165, 153, 139	35,35	VI
25	Quercetin-Rhamnosid	347, 295	447	301	62,85	VI
26	Protocatechusäure	291, 259	153	109	13,20	VII
27	Cyanidin	523, 275	285		55,24	VIII
28	Kaffeesäure-Derivat **	319, 295	445	179, 135	71,03	VIII
29	Kaffeesäure	323, 295	179	135	26,39	Coilfraktion
30	Quercetin	371, 295	301	179, 151, 107	70,91	Coilfraktion
31	Myricetin	375, 295	317	179, 151, 137, 107	63,60	Coilfraktion
32	<i>p</i> -Cumarsäure	311, 291	163	119	40,30	Coilfraktion
33	Phloroglucinolaldehyd	287	153	125, 107, 83	29,41	Coilfraktion
34	Malvidin	535, 275	329		64,17	Coilfraktion
35	Peonidin	527, 275	299		63,60	Coilfraktion
36	Petunidin	531, 275	315		59,80	Coilfraktion

*Strukturaufklärung über Isolierung und NMR-Spektroskopie. **Strukturvorschlag aufgrund der angegebenen Daten. Die angegebenen Retentionszeiten (R_t) wurden mittels der LC-MS-Methode nach Kapitel 5.3.6 unter Verwendung der HPLC-Methode I (5.3.4.2) bestimmt.

Die Fraktion Ic enthielt zudem noch 5-Feruloyl-Chinasäure (5-FQA), deren Struktur und Veresterungsposition, genauso wie bei der Identifizierung der Chlorogensäure (5-CQA) und der 5-Cumaroyl-Chinasäure (5-pCuQA) aus der Fraktion II, anhand der ESI-MS Fragmentierung und dem Vergleich mit den in der Literatur gefundenen Daten eindeutig identifiziert werden konnte (Clifford et al., 2003). Die Fraktion II und auch die Fraktion III enthielten zudem noch ein Depsid (2-O-(3,4,5-Trihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxyphenyllessigsäure), welches ebenfalls mittels LSRCCC in einer

ausreichenden Menge aus der Copigmentfraktion angereichert und anschließend isoliert werden konnte. Das Depsid könnte für die hohe antioxidative Aktivität der Fraktionen II und III verantwortlich sein. Außerdem konnten in den Fraktionen III und IV Gallussäure und Epicatechin sowie in Fraktion IV Catechin und Delphinidin nachgewiesen werden. Neben Delphinidin konnten in Fraktion V auch ein Caffeoyle-Shikimisäure-Derivat anhand der MSⁿ-Daten sowie Quercetin-3-arabinosid identifiziert werden. Das Quercetin-3-arabinosid fand sich auch in Fraktion VI, wo es zusammen mit 5-Hydroxy-Vanillinsäure, Quercetin-3-rhamnosid sowie mit Spuren einer Verbindung, deren Fragmentierung auf ein weiteres Depsid hindeutet, angereichert werden konnte. Allerdings war der Gehalt dieser Verbindung so gering, dass sie auch durch die LSRCCC-Trennung nicht in der für die Isolierung notwendigen Menge angereichert werden konnte. Fraktion VII beinhaltete Protocatechusäure und in Fraktion VIII konnten Cyanidin und ein unbekanntes Kaffeesäure-Derivat mit einer molaren Masse von 446 angereichert werden. Die Coilfraktion enthielt letztendlich die unpolaren Verbindungen der Copigmentfraktion wie Kaffeesäure, Quercetin, Myricetin, p-Cumarsäure, die Anthocyanidine Peonidin, Petunidin und Malvidin, sowie das beim Anthocyanabbau entstehende Phloroglucinolaldehyd, welches aus der Spaltung der Aglykone in Phloroglucinolaldehyd und eine Phenolcarbonsäure resultiert. Anhand dieser Trennung konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die durch Extraktion mit Ethylacetat aus dem Heidelbeerextrakt erhaltene Copigmentfraktion mittels HSCCC zu fraktionieren und einzelne Verbindungen anzureichern. Dadurch konnten mittels TEAC-Assay Hinweise auf besonders antioxidativ wirksame Verbindungen in der Copigmentfraktion erhalten werden. Außerdem gelang es, 36 Hauptkomponenten der sehr komplex zusammengesetzten Copigmentfraktion soweit zu fraktionieren, dass eine eindeutige Identifizierung der Verbindungen mittels HPLC-DAD-ESI-MS möglich wurde. Abb. 3.32 zeigt die so identifizierten Verbindungen im HPLC-Chromatogramm der Copigmentfraktion des Heidelbeerextraktes. Die Nummerierung stimmt mit den Verbindungen der Tab. 3.6 überein.

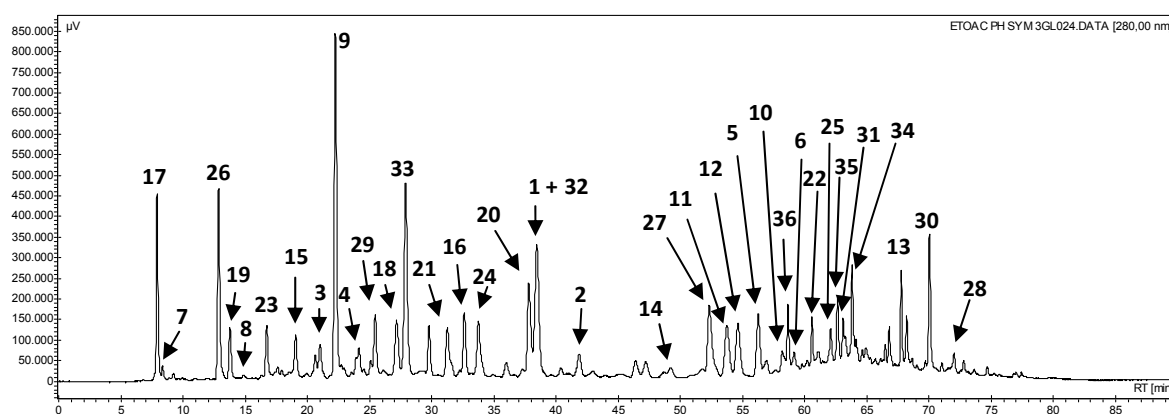


Abb. 3.32: HPLC-Chromatogramm der Copigmentfraktion des Heidelbeerextraktes. Nummerierung der Verbindungen nach Tab. 3.6.

Bei der Identifizierung der Verbindungen zeigte sich aber auch, dass neben Resten von Anthocyanen durch die Extraktionsmethode vor allem auch die lipophileren Aglykone (Anthocyanidine) aus dem Extrakt in die Copigmentfraktion gelangen. Um dies zu verhindern, bietet sich die vorherige Entfernung der Anthocyane und deren Aglykone mittels Membranchromatographie (siehe Kapitel 3.5.3) an. Zur Isolation und Strukturaufklärung unbekannter Verbindungen, bzw. von Verbindungen, von denen keine Standards vorhanden waren, reichten die Ausbeuten und Fraktionsgrößen der HSCCC-Fractionen nicht aus. Deshalb wurde ein Scale-Up der Methode auf der Low-Speed Rotary Countercurrent Chromatography (LSRCCC) durchgeführt.

3.4.2 Trennung von Heidelbeercopigmenten mittels LSRCCC

Im vorherigen Kapitel konnte bereits die erfolgreiche Trennung der Copigmentfraktion aus dem Heidelbeerextrakt mittels HSCCC gezeigt werden. Bei der Trennung mittels der LSRCCC gibt es jedoch den entscheidenden Vorteil, dass durch das größere Coilvolumen auch größere Probenmengen getrennt, sowie Minorkomponenten in den einzelnen Fraktionen angereichert werden können. Aus diesem Grund wurde durch Extraktion mit Ethylacetat zunächst aus 90 g Heidelbeerextrakt eine Copigmentfraktion extrahiert. Dazu wurde der Extrakt in Portionen zu jeweils 10 g gelöst und wie im Material und Methodenteil beschrieben (siehe Kapitel 5.4.7) mit Ethylacetat extrahiert. Aus insgesamt 40 L der Ethylacetatphase wurden nach Einengen am Rotationsverdampfer und Gefriertrocknung 12 g der Copigmentfraktion erhalten. Das Extraktionsschema ist in Abb. 3.33 dargestellt.

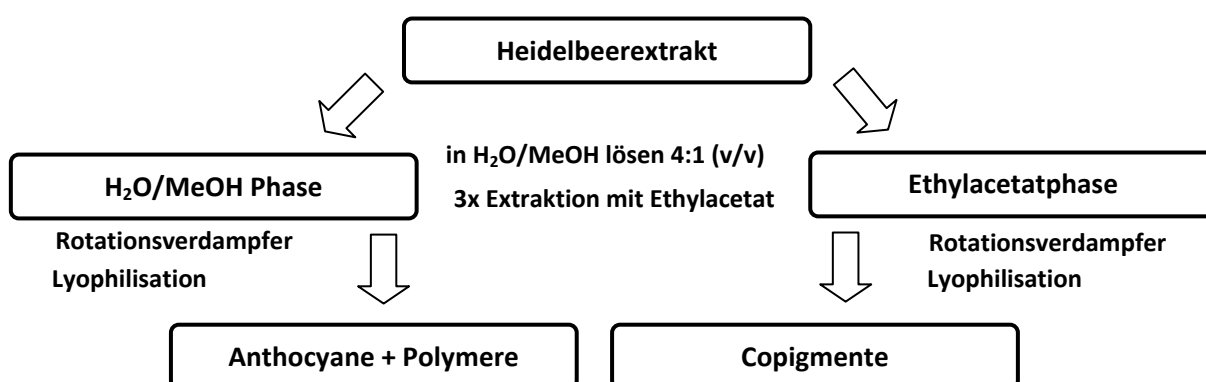


Abb. 3.33: Extraktionsschema zur Gewinnung einer Copigmentfraktion aus dem Heidelbeerextrakt zur Trennung mittels LSRCCC.

Für die Trennung mittels LSRCCC wurden 11,30 g der erhaltenen Copigmentfraktion eingesetzt. Als Fließmittelsystem diente in Übereinstimmung mit der HSCCC-Trennung im vorhergehenden Kapitel ein Gemisch aus Hexan/Ethylacetat/MeOH/Wasser 1:5:1:5 (v/v/v/v). Getrennt wurde anfangs im U-O-T-Modus, wobei die obere Phase (upper-Phase) als mobile Phase von außen zum Inneren des Coils und vom Tail zum Head gepumpt wurde (vergl. Kapitel 2.3.3.2). Nach 4 h wurde die Rotationsrichtung (50 U/min) jedoch aufgrund der schlechten Retention an stationärer Phase umgekehrt und im U-O-H-Modus fortgefahren. Dabei wurde die mobile Phase weiterhin mit einem Fluss von 5 mL/min von außen zum inneren des Coils, jedoch aufgrund der Rotationsumkehr, jetzt vom Head zum Tail gepumpt. Der Durchbruch der mobilen Phase erfolgte nach 17,8 h, wobei der Fraktionssammler auf 12 min pro Reagenzglas eingestellt war, und jedes Reagenzglas somit 60 mL fasste. Die Abb. 3.34 zeigt das erhaltene Chromatogramm der LSRCCC-Trennung. Aufgrund der Verwendung der schweren Phase des Fließmittelsystems als stationäre Phase eluierten, im Gegensatz zur HSCCC-Trennung im vorhergehenden Kapitel, die lipophilen Verbindungen, wie z. B. das im Extrakt enthaltene Quercetin, durch den nun geringeren Verteilungskoeffizienten zuerst. Die hohe Absorption der Durchbruchfraktion bei den Wellenlängen 280 und 520 nm wurde durch die Anthocyanidine verursacht, die aufgrund des fehlenden Zuckerrestes und ihres lipophileren Charakters sehr früh eluierten. Zwischen 26 und 34 h eluierten die etwas hydrophileren Copigmente, wie z. B. die Quercetin-Glykoside und die Chlorogensäure, während die Reste an Anthocyanen, die bei der Extraktion mit Ethylacetat in die Copigmentfraktion gelangten, auf dem Coil zurückblieben. Durch Einpumpen von Wasser wurde anschließend der Coilrückstand vom Coil gedrückt und

fraktioniert aufgefangen, wobei sich die Anthocyane in den letzten zwei Litern der Coilfraktion 2 befanden.

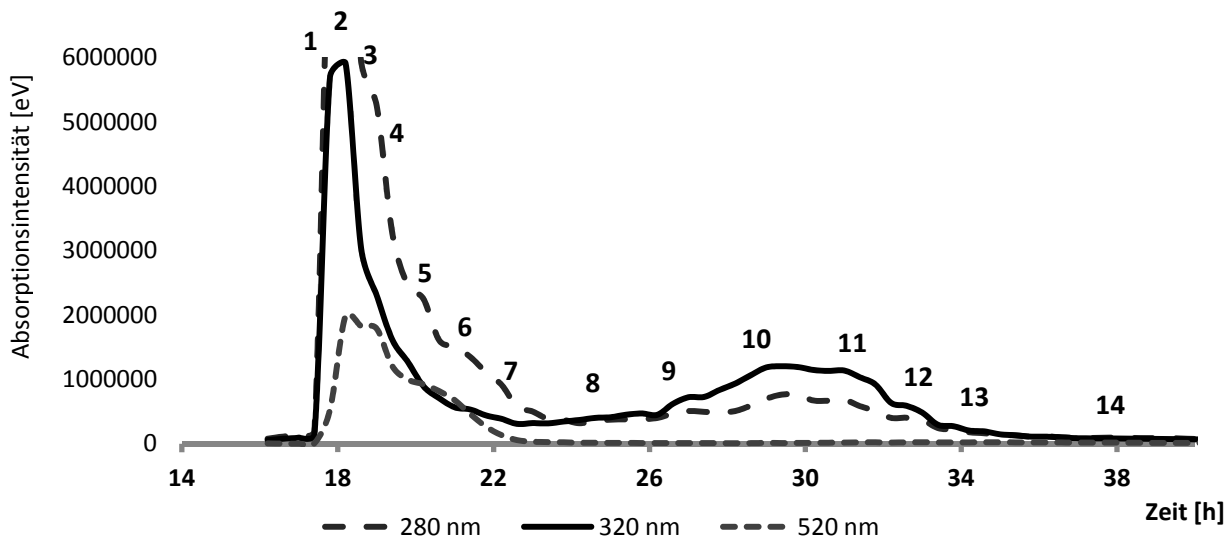


Abb. 3.34: Mittels HPLC-DAD Messungen erhaltenes Chromatogramm der Trennung von 11,3 g der Copigmentfraktion aus Heidelbeerextrakt.

Anhand des erhaltenen Chromatogrammes und der HPLC-Messungen wurden, einschließlich der 2 Coilfraktionen, insgesamt 16 Fraktionen erhalten. Diese wurden gefriergetrocknet und per HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS untersucht. Die Abb. 3.35 zeigt einige HPLC-DAD-Chromatogramme ausgesuchter Fraktionen.

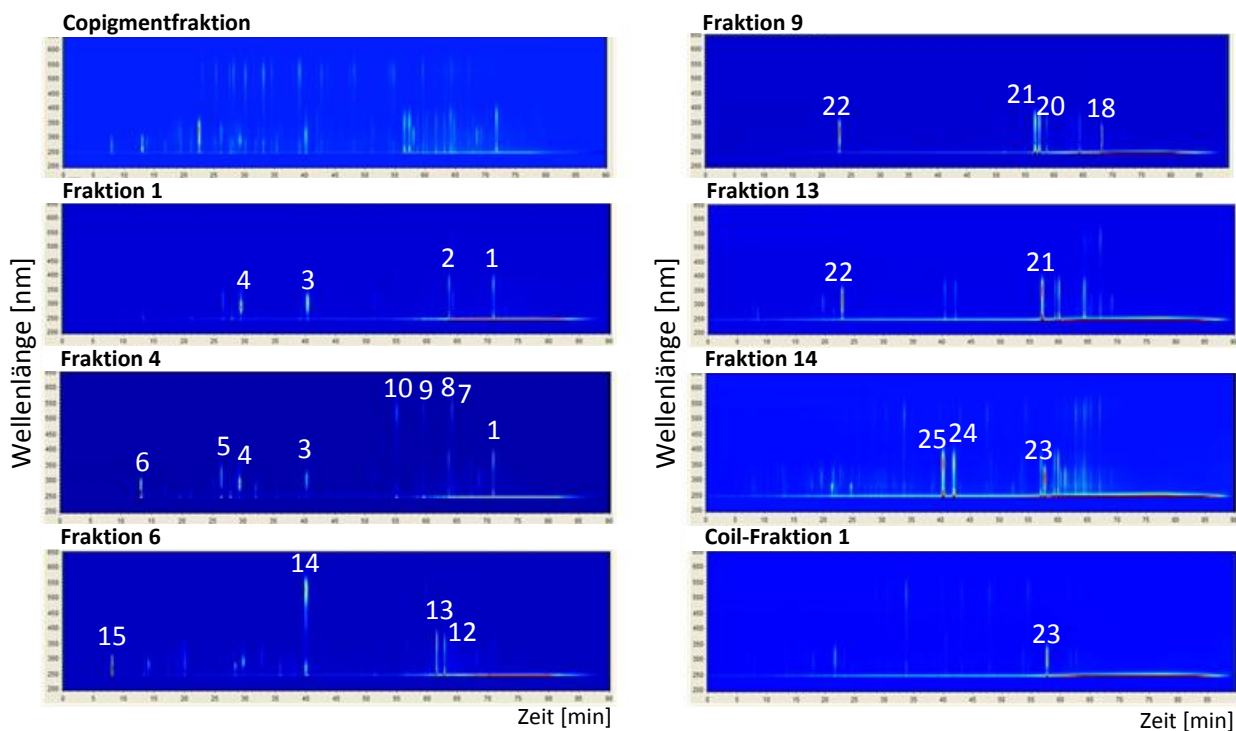


Abb. 3.35: HPLC-DAD-Chromatogramme einiger ausgewählter LSRCCC-Fractionen der Trennung der Copigmentfraktion des kommerziellen Heidelbeerextraktes (Nummerierung siehe Tab. 3.8).

Die Tab. 3.7 zeigt die nach Gefriertrocknung erhaltenen Ausbeuten der Fraktionen. Es wird sehr deutlich, dass es mit Hilfe der LSRCCC gelungen ist, trotz des sehr späten Durchbruchs und der damit verbundenen schlechten Retention an stationärer Phase ($R_s = 7,3\%$), wie bereits bei der Trennung mittels HSCCC (vergl. Kapitel 3.4.1), einzelne Inhaltsstoffe in den Fraktionen anzureichern und die sehr komplex zusammengesetzte Copigmentfraktion erfolgreich zu fraktionieren.

Tab. 3.7: Nach Gefriertrocknung erhaltene Auswaagen der LSRCCC Fraktionen

Fraktion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Coil 1	Coil 2
[mg]	670	404	976	777	473	778	312	208	454	337	693	252	213	633	551	1574

Die Fraktionsgrößen waren im Vergleich zur HSCCC bedeutend größer, so dass die in den Fraktionen enthaltenen Minorverbindungen durch weitere HSCCC-Trennungen der LSRCCC-Fraktionen und anschließender präparativer HPLC in den für die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie notwendigen Mengen isoliert werden konnten. Es konnten alle im vorherigen Kapitel 3.4.1 gefundenen Verbindungen auch in den LSRCCC-Fraktionen angereichert werden. Jedoch sind in der Tab. 3.8 ausschließlich die 25 Hauptverbindungen aufgeführt, deren Identifizierung mittels Standards und HPLC-DAD-MS gelang bzw. welche durch die anschließende Isolierung und mittels NMR-Spektroskopie identifiziert werden konnten. Minorkomponenten, die nicht durch Standards sicher identifiziert und aufgrund ihrer niedrigen Gehalte isoliert werden konnten, sind nicht mit aufgeführt.

Tab. 3.8: Übersicht über die per HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS bestimmten charakteristischen Daten wie maximale UV Absorption, Retentionszeit und Fragmentierung der Hauptverbindungen in den LSRCCC-Fraktionen.

Nr.	Verbindung	λ_{\max} [nm]	ESI-MS (negativer Modus) [M-H] ⁻	Fragmente [m/z]	R_t^{**} [min]	Fraktion
1	Quercetin	371, 295	301	179, 151, 107	70,91	1,2,3
2	Myricetin	375, 295	317	179, 151, 137, 107	63,60	1,2,3
3	p-Cumarsäure	311, 291	163	119	40,30	1,2,3
4	Phloroglucinolaldehyd	287	153	125, 107, 83	29,41	1,2,3,4,5,6
5	Kaffeesäure	323, 295	179	135	26,39	1,2,3,4,5,6
6	Protocatechusäure	291, 259	153	109	13,20	1,2,3,4,5
7	Malvidin	535, 275	329		64,17	4
8	Peonidin	527, 275	299		63,60	4
9	Petunidin	531, 275	315		59,80	4,5
10	Cyanidin	523, 275	285		55,24	4,5
11	5-Hydroxy-Vanillinsäure	275	183	168, 139, 124	17,23	4,5
12	Quercetin-Rhamnosid	347, 295	447	301	62,85	5,6
13	Quercetin-Arabinosid	351, 295	433	301	61,52	5,6
14	Delphinidin	527, 275	301		40,31	5,6
15	Gallussäure	271	169	125	8,03	5,6,7
16	Epicatechin	279	289	245, 179, 125	28,48	6
17	Catechin	279	289	245, 179, 125	14,05	6
18	Cumarsäure-Derivat *	311, 295	411	163, 145, 119	68,11	7,8,9
19	Depsid 1*	279	335	183, 169, 165, 139	20,20	7, 8, 9
20	Quercetin-Glucuronid	351, 259	477	301	57,45	8,9,10,11,12,13
21	Quercetin-Galactosid	351, 259	463	301	55,91	8,9,10,11,12
22	Chlorogensäure (5-CQA)	299, 327	353	191	22,97	9,10,11,12,13
23	Cumaroyl-Iridoid Isomer 1*	311, 295	535	491, 371, 329, 311, 191, 163	57,71	14, Coil 1
24	Myricetin-Glucosid	351, 295	479	316	42,33	14, Coil 1
25	Myricetin-Galactosid	351, 295	479	316	40,44	14, Coil 1

*Strukturaufklärung über Isolierung und NMR-Spektroskopie. **Die angegebenen Retentionszeiten (R_t) wurden mittels der LC-MS-Methode nach Kapitel 5.3.6 unter Verwendung der HPLC-Methode I (5.3.4.2) bestimmt.

Von den 25 Hauptkomponenten der Copigmentfraktion konnten 3 Verbindungen nicht anhand der gemessenen Daten identifiziert und mit Standardsubstanzen bestätigt werden. Sie wurden mittels HSCCC und präparativer HPLC aus den LSRCCC-Fractionen isoliert. So ist in Fraktion 14 und 15 eine Verbindung enthalten, deren Fragmentierung (siehe Abb. 3.36) auf ein Cumaroyl-Iridoid hindeutete (Hokkanen et al., 2009). Diese Verbindung wurde nach Isolierung und Strukturaufklärung als 10-*p-trans*-Cumaroyl-1S-Monotropein identifiziert. Aus Fraktion 7 wurde das Cumarsäure-Derivat (2*S*,4*R*)-4-(β -D-Glucopyranosyloxy)-pentan-2-yl-(2*E*)-*p*-cumarat und das Depsid 2-O-(3,4,5-Trihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxyphenylelessigsäure isoliert. Im folgenden Kapitel 3.4.3 wird die Isolierung und Strukturaufklärung dieser Verbindungen aus den LSRCCC Fractionen gezeigt.

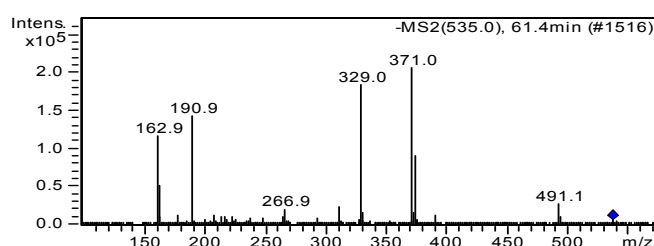


Abb. 3.36: MS²-Massenspektrum von 10-*p-trans*-Cumaroyl-1S-Monotropein, ein Cumaroyl-Iridoid aus der Copigmentfraktion des Heidelbeerextraktes.

3.4.3 Isolierung und Strukturaufklärung neuer Verbindungen aus der Copigmentfraktion

Im vorherigen Kapitel konnte die erfolgreiche Trennung der Copigmentfraktion aus dem Heidelbeerextrakt mittels LSRCCC und die Anreicherung von Minorkomponenten in den einzelnen LSRCCC-Fractionen gezeigt werden. Um drei bis dahin nicht identifizierbare Verbindungen zu erhalten, wurden einige LSRCCC-Fractionen mittels HSCCC weiter aufgetrennt, anschließend die Zielverbindungen mittels präparativer HPLC isoliert und ihre Struktur mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt. Als Beispiel für die gute Kombinierbarkeit aus LSRCCC zur Anreicherung und HSCCC zur Isolierung wird im Folgenden die HSCCC-Trennung von 670 mg der LSRCCC-Fraktion 1, mit den unpolaren Copigmenten des Extraktes, gezeigt. Die Abb. 3.37 zeigt das HPLC-DAD-Chromatogramm dieser zur Trennung eingesetzten LSRCCC-Fraktion.

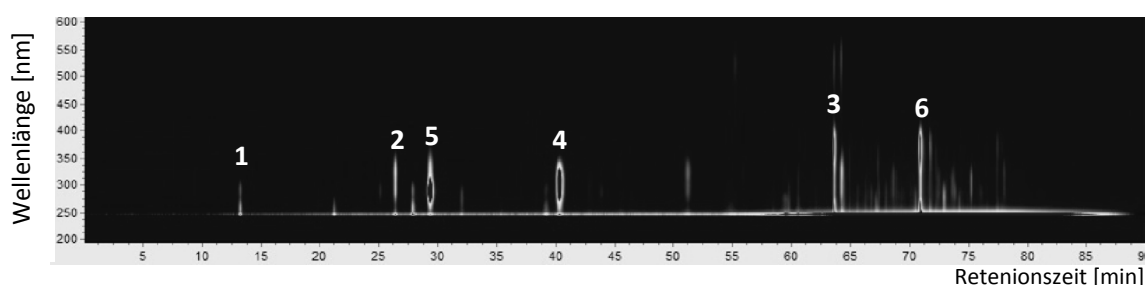


Abb. 3.37: HPLC-DAD-Chromatogramm der LSRCCC-Fraktion 1.

Die Abb. 3.38 zeigt das HSCCC-Chromatogramm der Trennung bei der Detektionswellenlänge von 280 nm. Verwendung fand das Fließmittelsystem Hexan/Ethylacetat/MeOH/H₂O im Verhältnis 3:5:3:5 (v/v/v/v) bei einem Fluss von 3 mL/min mit der polareren Phase als stationäre Phase des Fließmittelsystems. Bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 900 U/min wurde im Head to Tail Modus getrennt.

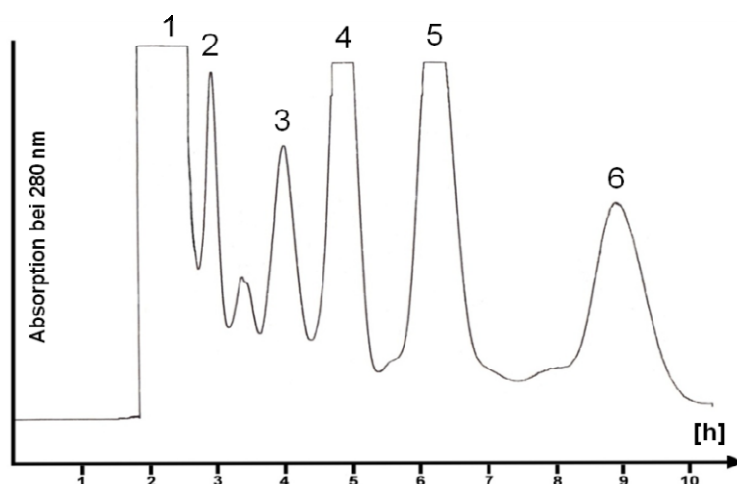


Abb. 3.38: HSCCC-Chromatogramm der Trennung von 670 mg der LSRCCC-Fraktion 1.

Die Protocatechusäure koeluierte aufgrund ihres geringen Verteilungskoeffizienten in dem Fließmittelsystem mit vielen ähnlich polaren oder polareren Verbindungen in der Durchbruchfraktion (1). Dies erklärt ihren geringen Anreicherungsgrad von nur 11% in dieser

Fraktion. Die weiteren Copigmente wie Kaffeesäure, Myricetin, *p*-Cumarsäure und Phloroglucinolaldehyd wurden mit hohen Reinheiten > 80% mit den folgenden Fraktionen erhalten. Die Tab. 3.9 gibt einen Überblick über die Verbindungen, die Auswaagen und die chromatographischen Reinheiten der einzelnen HSCCC-Fractionen. Das Quercetin wurde aufgrund seines lipophilen Charakters mit der letzten Fraktion in einer chromatographischen Reinheit von 98% (HPLC-DAD, 280 nm) und einer Ausbeute von 70 mg erhalten. So kann gezeigt werden, dass es durch die Kombination von LSRCCC und HSCCC gelungen ist, ein geeignetes System zu finden, um auch die unpolaren Copigmente aus dem Heidelbeerextrakt zu isolieren.

Tab. 3.9: Ausbeuten und Reinheiten der in den HSCCC-Fractionen angereicherten Copigmente

Fraktion	Verbindung	[mg]	[%] HPLC (280 nm)
1	1) Protocatechusäure	53	11
2	2) Kaffeesäure	22	81
3	3) Myricetin	39	86
4	4) <i>p</i> -Cumarsäure	33	90
5	5) Phloroglucinolaldehyd	35	96
6	6) Quercetin	70	98

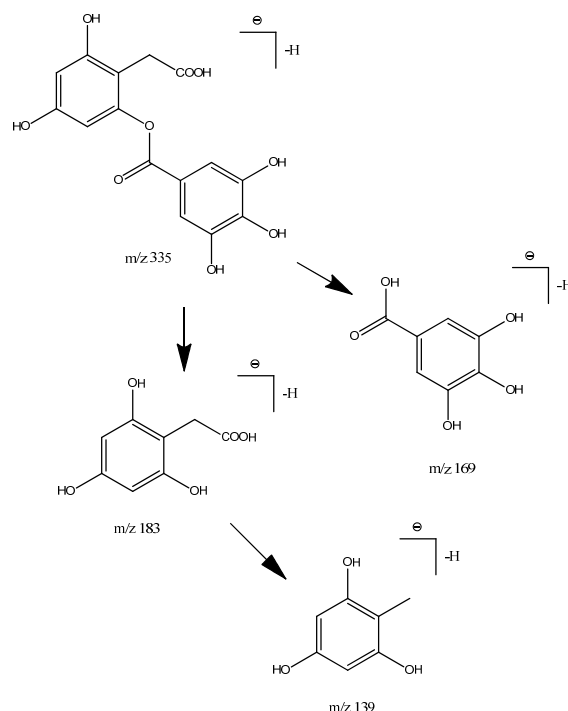
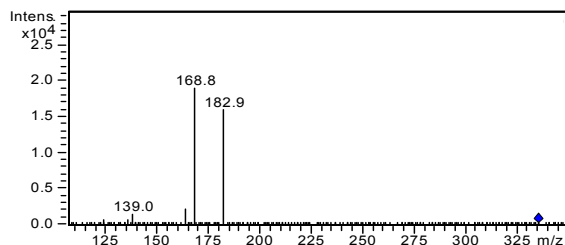


Abb. 3.39: MS²-Fragmentierung (oben) und vorgeschlagener Fragmentierungsmechanismus (rechts) des Depsids mit dem Pseudo-molekülion [M-H]⁻ *m/z* 335.

Um auch die bis dahin unbekannten und nicht identifizierten Verbindungen der Copigmentfraktion zu isolieren, wurden weitere LSRCCC-Fractionen mittels HSCCC getrennt. So konnten in den LSRCCC-Fractionen 7, 8 und 9 neben Chlorogensäure, Gallussäure, Quercetin-Galactosid und Quercetin-Glucosid noch zwei weitere Verbindungen angereichert werden, die allein aufgrund der Retentionszeiten, des UV-Spektrums und der Fragmentierung in den durchgeführten HPLC-DAD-ESI-MS-Analysen nicht identifizierbar waren. Bei der ersten Verbindung mit einem Pseudomolekülion [M-H]⁻ von *m/z* 411 im negativen Ionisierungsmodus ließ sich aufgrund der Fragmentierung *m/z* 163, 145, 119 darauf schließen, dass es sich um ein Cumarsäure-Derivat handelt. Das passte auch zum UV-Spektrum dieser Verbindung, welche Absorptionsmaxima bei 311 nm und 295 nm zeigte. Die Fragmentierung der zweiten Verbindung ließ auf ein Depsid und damit auf ein Kondensationsprodukt aus zwei Phenolcarbonsäuren schließen. Die Abb. 3.39 zeigt das MS²-Spektrum des Depsids und den postulierten Fragmentierungsmechanismus.

Zur Isolierung und Strukturaufklärung dieser Verbindungen wurden die Fraktionen 7, 8 und 9 aus der LSRCCC-Trennung vereinigt und insgesamt 950 mg dieser Fraktionen einer HSCCC-Trennung mit dem Fließmittelsystem Ethylacetat/H₂O im Verhältnis 1:1 (v/v) bei einem Fluss von 3 mL/min und einer Rotationsgeschwindigkeit von 900 U/min unterzogen. Die Abb. 3.40 zeigt das HSCCC-Chromatogramm dieser Trennung, die im Elution-Extrusion-Modus durchgeführt wurde. Dabei wurde zunächst die unpolare Phase des Fließmittelsystems als stationäre Phase verwendet und es eluierten nach dem Durchbruch zunächst die polareren Copigmente.

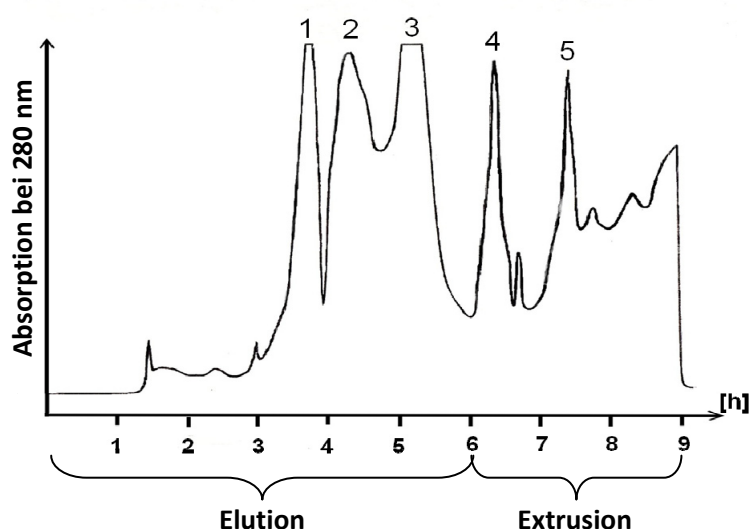


Abb. 3.40: HSCCC-Chromatogramm der Trennung von 950 mg der LSRCCC-Fraktionen 7-9.

Nach sechs Stunden wurde die mobile Phase gewechselt und die unpolareren Verbindungen, mit Verteilungskoeffizienten > 2 , die sich in der stationären Phase auf dem Coil angereichert hatten, wurden durch das Einpumpen weiterer stationärer Phase, bei einem Fluss von 5 mL/min und einer Rotationsgeschwindigkeit von 800 U/min, fraktioniert vom Coil gedrückt. Nachdem in den ersten Fraktionen die polareren Verbindungen wie Chlorogensäure (F1), Quercetin-3-galactosid und Quercetin-3-glucuronid (F2) sowie das Cumarsäure-Derivat (F3) isoliert werden konnten, wurden nach der Umstellung auf den Extrusion-Modus auch die Gallussäure (F4) und das Depsid (F5) erhalten.

Tab. 3.10: Übersicht über die Ausbeuten und Reinheiten der in den HSCCC-Fraktionen angereicherten Verbindungen

Fraktion	Verbindung	[mg]	% HPLC (280 nm)
F1	Chlorogensäure	58	86,3
F2	Quercetin-3-galactosid	102	33,8
	Quercetin-3-glucuronid		41,0
F3	Cumarsäure-Derivat	100	65,9
F4	Gallussäure	47	81,2
F5	Depsid	69	63,2

Tab. 3.10 zeigt einen Überblick über die Ausbeuten der nach Gefriertrocknung erhaltenen HSCCC-Fraktionen, die darin angereicherten Verbindungen, sowie die ermittelten chromatographischen Reinheiten (280 nm). Das Depsid wurde aus Fraktion 5 mittels präparativer HPLC isoliert. Es wurden 10 mg der Verbindung mit einer Reinheit von 99,5% erhalten und mittels NMR-Spektroskopie analysiert. Die Abb. 3.41 zeigt das ¹H-NMR-Spektrum des isolierten Depsids.

Das Singulett bei der chemischen Verschiebung ppm 7,10 zeigt die aufgrund der gegebenen Symmetrie äquivalenten benzyllischen Protonen H2' und H6' der Gallussäure. Die benachbarte entschirmend wirkende Säurefunktion am C7'-Kohlenstoffatom kompensiert den abschirmenden Einfluss der Hydroxylgruppen in ortho- und meta-Stellung und ist verantwortlich für die weite Verschiebung des Signals ins tiefe Feld.

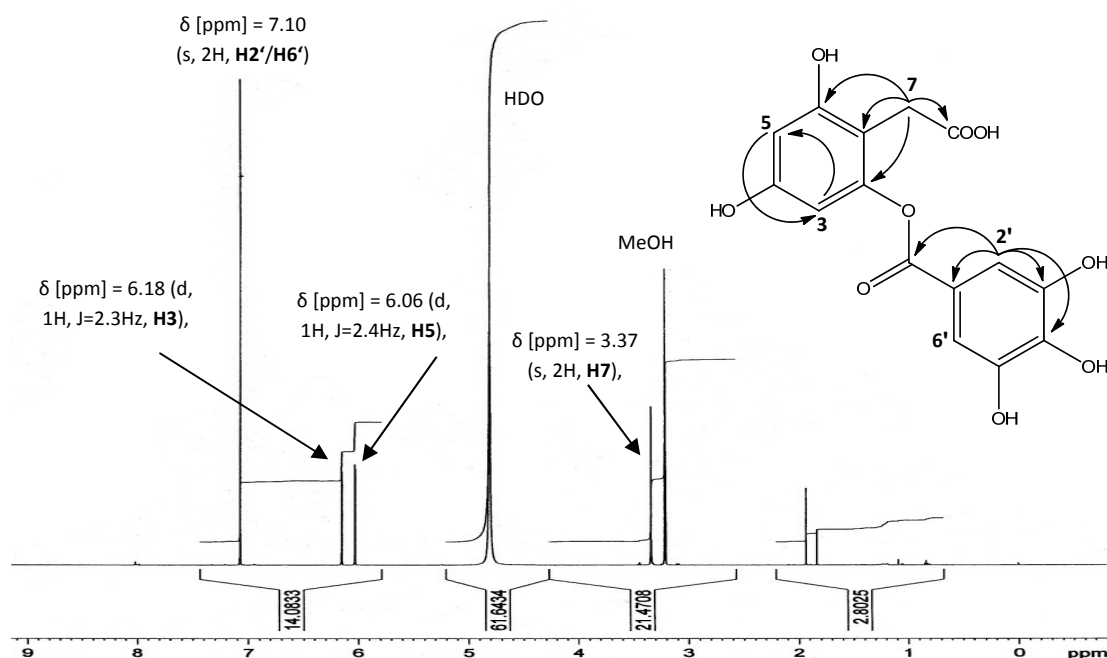


Abb. 3.41: ^1H -NMR Spektrum von 2-O-(3,4,5-Trihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxyphenylethanoic acid aus Heidelberg isoliertes Depsid, sowie zur Strukturaufklärung wichtige $^2,3\text{J}$ - ^1C - ^{13}H -Fernkorrelationen des HMBC-Spektrums.

Durch Korrelation dieser Protonen im HMBC-Experiment mit den benachbarten Kohlenstoffatomen C3', C4' C5' und C1' sowie mit dem Kohlenstoffatom der Carbonsäurefunktion C7' bei ppm 166,6 des in Abb. 3.42 gezeigten ^{13}C -NMR-Spektrums, konnte dieser Teil der Struktur bestätigt werden. Die beiden Dubletts bei ppm 6,18 sowie bei ppm 6,06 im ^1H -NMR-Spektrum können den Protonen H3 und H5 zugeordnet werden. Auch hier handelt es sich um aromatische Protonen, die aufgrund der Nachbarschaft zu Hydroxylgruppen etwas stärker abgeschirmt werden, weshalb die Signale nicht ganz so weit ins tiefe Feld verschoben sind. Die Kopplungskonstante dieser Dublettsignale von 2,3 Hz ist typisch für benzyllische Protonen in Metastellung. Die einzigen zwei nicht aromatischen Protonen finden sich am C7-Kohlenstoffatom. Sie verursachen ein Singulett bei ppm 3,37 im ^1H -NMR-Spektrum.

Im HMBC-Spektrum korrelieren diese Protonen mit dem C8-Kohlenstoffatom der benachbarten Carbonsäurefunktion bei ppm 175,9, sowie mit den Kohlenstoffatomen C1, C2 und C6 im ^{13}C -NMR-Spektrum. Das C7-Kohlenstoffatom bei ppm 30,0 im ^{13}C -NMR-Spektrum zeigt die typische Verschiebung für aliphatische Protonen ins hohe Feld. Auch alle anderen Kohlenstoffatome der vorgeschlagenen Struktur konnten den Signalen im ^{13}C -NMR-Spektrum in Abb. 3.42 zugeordnet werden. So konnte die mittels der ESI-MS-Fragmentierung vorgeschlagene Struktur bestätigt, als die Verbindung 2-O-(3,4,5-Trihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxyphenylethanoic acid identifiziert und dieses Ergebnis mittels der 2D-Experimente H,H-COSY, HMBC und HSQC abgesichert werden.

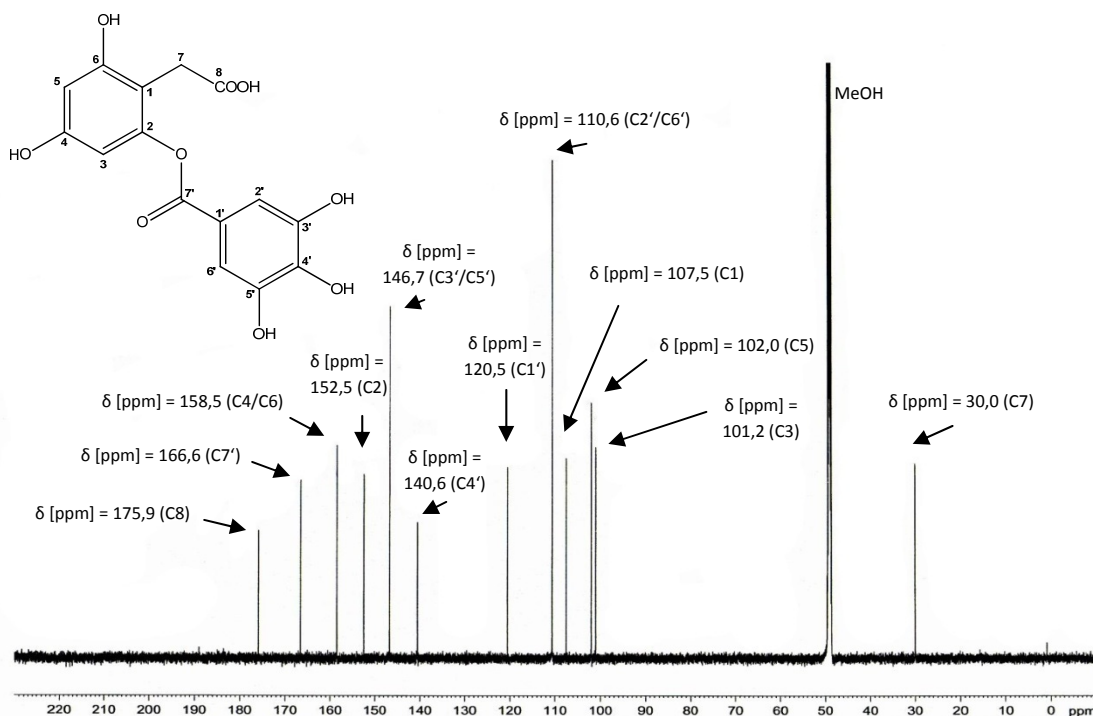


Abb. 3.42: ^{13}C -NMR Spektrum von 2-O-(3,4,5-Trihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxyphenylessigsäure, ein aus Heidelbeerextrakt isoliertes Depsid.

Zur Isolierung der unbekannten Verbindung, deren UV-Spektrum durch die typischen Absorptionen und deren MS^2 -Spektrum durch die Fragmente m/z 163 und 119 auf ein Cumarsäure-Derivat hindeuteten (siehe Abb. 3.43), wurden 50 mg der HSCCC-Fraktion 3 mittels präparativer HPLC aufgereinigt und 20 mg der Verbindung mit einer chromatographischen Reinheit von 99,6% (280 nm) erhalten.

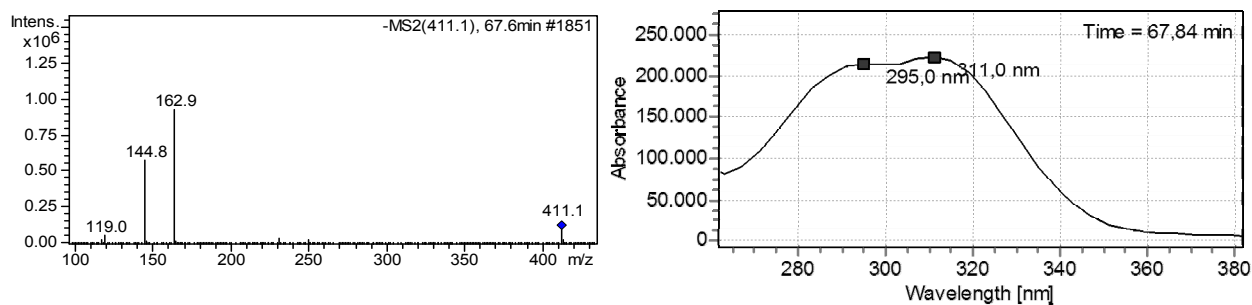


Abb. 3.43: MS^2 -Fragmentierung (links) und UV-Spektrum (rechts) des Cumarsäure-Derivates.

Die Abb. 3.44 zeigt das ^1H -NMR-Spektrum dieser Verbindung. Es konnten sehr schnell die einzelnen Teilstrukturen wie die *p*-Cumarsäure und die Glucose identifiziert und den einzelnen Signalen zugeordnet werden. Sie sind durch eine Ester- und eine glykosidische Bindung über ein chirales Pentan-2,4-diol miteinander verbunden. Es handelt sich um die Verbindung (2*S*,4*R*)-4-(β -D-Glucopyranosyloxy)-pentan-2-yl-(2*E*)-*p*-cumarat, die 2009 erstmals in Stielen aus Wildheidelbeeren entdeckt und isoliert werden konnte (Hybelbauerová et al., 2009). Nun ist es gelungen, diese Verbindung mittels Countercurrent Chromatographie aus einem Heidelbeerextrakt zu isolieren. Die im Folgenden gezeigten Signale des erhaltenen ^1H -NMR Spektrums stimmen sehr gut mit den Daten nach Hybelbauerová et al. (2009) überein.

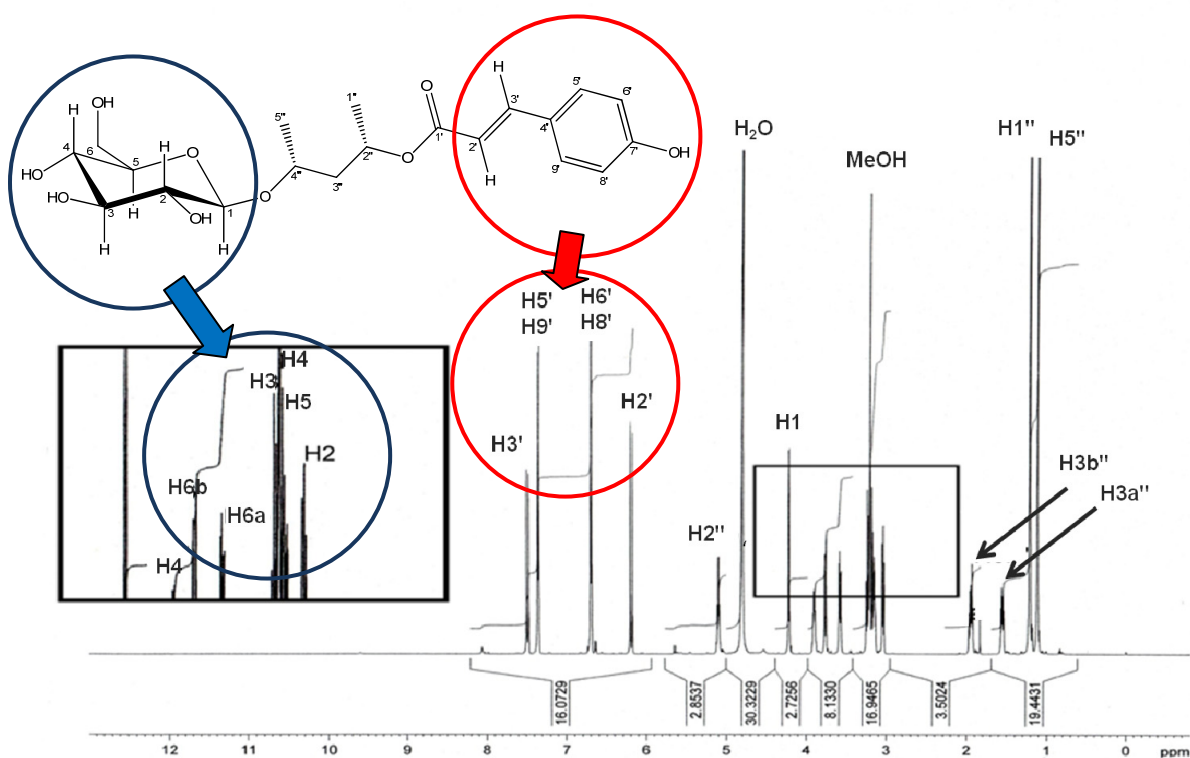


Abb. 3.44: ^1H -NMR Spektrum von (2S,4R)-4-(β -D-Glucopyranosyloxy)-pentan-2-yl-(2E)-p-cumarat.

Mittels der 2D-Experimente H,H-COSY , HMBC und HSQC konnte die Struktur bestätigt werden. Abb. 3.45 zeigt das HMBC -Spektrum der Verbindung.

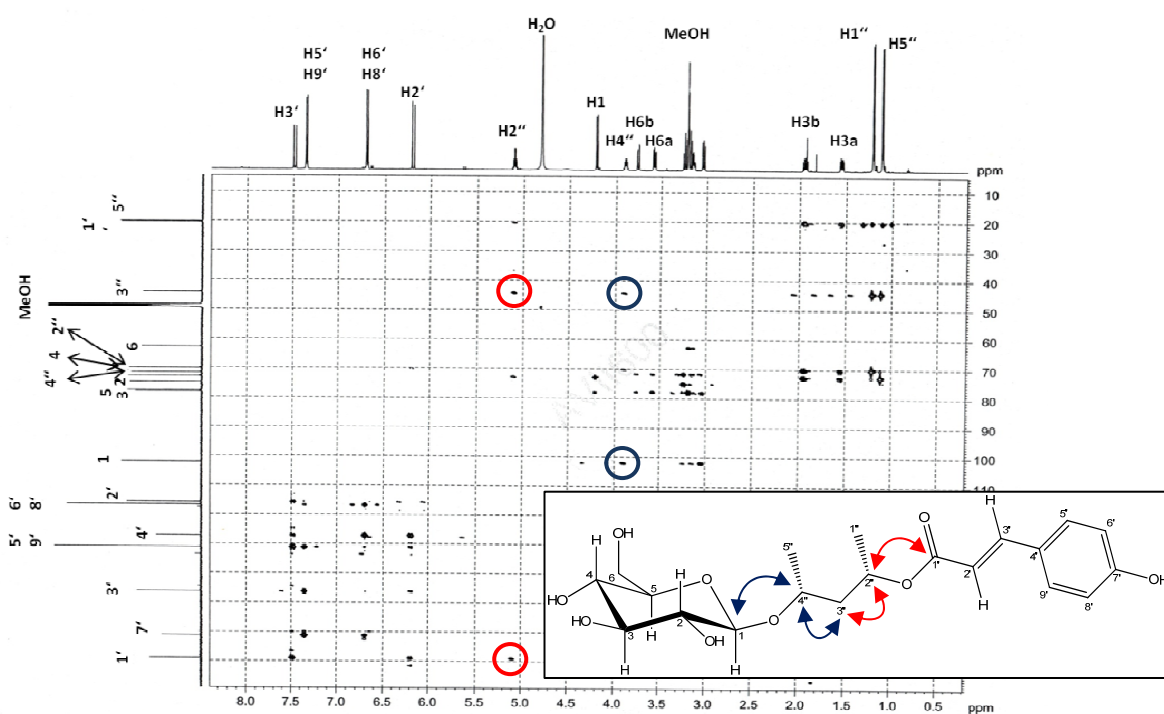


Abb. 3.45: HMBC -Spektrum von (2S,4R)-4-(β -D-Glucopyranosyloxy)-pentan-2-yl-(2E)-p-cumarat.

Tab. 3.11: ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Daten von (2*S*,4*R*)-4-(β -D-Glucopyranosyloxy)-pentan-2-yl-(2*E*)-*p*-cumarat. Spektren wurden bei 600 MHz (^1H -NMR) und 150 MHz (^{13}C -NMR) in CD_3OD aufgenommen.

C/H	δ_{H} [ppm]	δ_{C} [ppm]
1	4.25 (d, 1H, $J=7.8\text{Hz}$, H1)	102,1 (C1)
2	3.08 (dd, 1H, $J=7.9\text{Hz}$, $J=9.0\text{Hz}$, H2)	75,0 (C2)
3	3.28 (t, 1H, $J=8.9\text{Hz}$, H3)	78,1 (C3)
4	3.22 (m, overlapped 1H, H4)	71,6 (C4)
5	3.18 (m, overlapped 1H, H5)	77,8 (C5)
6	3.62 (dd, 1H, $J=5.3\text{Hz}$, $J=11.8\text{Hz}$, H6a), 3.80 (dd, 1H, $J=2.1\text{Hz}$, $J=11.9\text{Hz}$, H6b)	62,9 (C6)
1'		169,1 (C1')
2'	6.23 (d, 1H, $J=15.9\text{Hz}$, H2')	115,8 (C2')
3'	7.52 (d, 1H, $J=15.9\text{Hz}$, H3')	146,3 (C3')
4'		127,2 (C4')
5'	7.39 (m, 2H, H5'/H9')	131,2 (C5'/C9')
6'	6.74 (m, 2H, H6'/H8')	116,9 (C6'/C8')
7'		161,3 (C7')
8'	6.74 (m, 2H, H6'/H8')	116,9 (C6'/C8')
9'	7.39 (m, 2H, H5'/H9')	131,2 (C5'/C9')
1''	1.25 (d, 3H, $J=6.2\text{Hz}$, H1''abc)	20,5 (C1'')
2''	5.14 (m, H2'')	70,2 (C2'')
3''	1.59 (ddd, 1H, $J=5.3\text{Hz}$, $J=6.1\text{Hz}$, $J=13.9\text{Hz}$, H3''a) 1.99 (m, 1H, H3''b)	44,4 (C3'')
4''	3.94 (m, 1H, H4'')	72,9 (C4'')
5''	1.15 (d, 3H, $J=6.2\text{Hz}$, H5''abc)	20,2 (C5'')

Das Proton H4'' zeigt Korrelationen zum benachbarten C3''-Kohlenstoffatom sowie zum Kohlenstoffatom C1 des Zuckers. Das Proton H2'' zeigt ebenfalls Korrelationen zum C3''-Kohlenstoffatom sowie zum C1'-Kohlenstoffatom der *p*-Cumarsäure. Dadurch konnten die Verknüpfungspunkte der Teilstrukturen des Moleküls bestätigt werden. Durch die Verknüpfung des Zuckers und der *p*-Cumarsäure mit dem Pentan-2,4-diol entstehen zwei chirale Zentren. Die Konfiguration dieser Zentren konnte durch einen Vergleich der Signale des ^{13}C -NMR-

Spektrums mit den in der Literatur gefundenen Daten durch hohe Übereinstimmung gezeigt werden. Nach Hybelbauerová et al. (2009) handelt es sich um das dort beschriebene (2''*S*,4''*R*)-Isomer. Die Tab. 3.11 gibt Auskunft über die ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Daten der isolierten Verbindung.

Die dritte unbekannte Verbindung wurde aus der Coilfraktion 1 der LSRCCC-Trennung mittels HSCCC isoliert. Neben Spuren von Anthocyanidinen und einigen anderen Copigmenten enthielt diese Fraktion vor allem Chlorogensäure und die Zielverbindung. Abb. 3.46 zeigt das mittels HPLC-ESI-MS im negativen Ionisationsmodus erhaltene MS^2 -Spektrum der Zielverbindung.

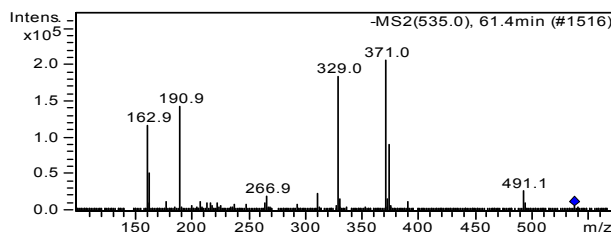
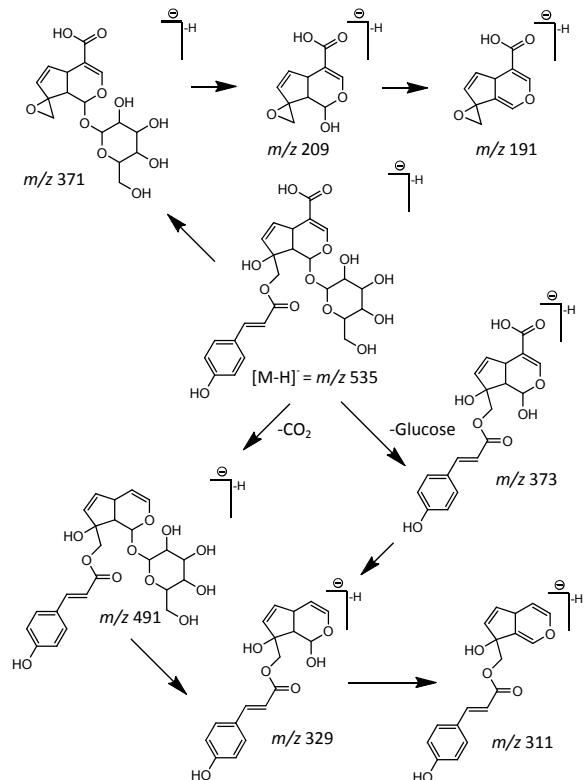


Abb. 3.46: MS^2 -Spektrum des Cumaroyl-Iridoids (oben) sowie der nach Hokkanen et al. (2009) vorgeschlagene Fragmentierungsmechanismus dieser Verbindung (rechts).



Das Fragment m/z 163 und die Absorptionsmaxima bei 311 und 295 nm im UV-Spektrum lassen vermuten, dass es sich ebenfalls um ein Cumarsäure-Derivat handelt. Die Fragmentierung stimmte mit der nach Hokkanen (2009) beschriebenen und ebenfalls in Abb. 3.46 gezeigten Fragmentierung zweier Cumaroyl-Iridoide, 10-*p-trans*- und 10-*p-cis*-Cumaroyl-1S-monotropein, überein. Nach Hokkanen et al. (2009) wurden diese Verbindungen erstmals mittels HPLC-ESI-MS in Heidelbeeren (*Vaccinium myrtillus*) und in Preiselbeeren (*Vaccinium vitis-idaea*) entdeckt, konnten allerdings bislang noch nicht zur sicheren Identifizierung und Strukturaufklärung aus Heidelbeeren isoliert werden. 10-*p-trans*-cumaroyl-1S-monotropein (Vaccinosid) wurde bisher auch in *Vaccinium bracteatum* (Sakakibara et al., 1973) und 10-*p-cis*-Cumaroyl-1S-monotropein (Andromedosid) in *Andromeda polifolia* (Chung et al., 1980) nachgewiesen.

Für die Isolierung mittels HSCCC wurden 630 mg der LSRCCC-Coilfraktion I eingesetzt und mit dem Fließmittelsystem Ethylacetat/*n*-BuOH/H₂O, 1:1:1 (v/v/v), bei einem Fluss von 3 mL/min sowie einer Rotationsgeschwindigkeit von 900 U/min getrennt. Nach 7 Stunden wurde auch diese Trennung durch Wechsel der mobilen Phase, bei einem Fluss von 5 mL/min und einer Rotationsgeschwindigkeit von 800 U/min, im Extrusions-Modus fortgeführt.

Abb. 3.47 zeigt das Chromatogramm der Trennung. Aus der HSCCC-Fraktion 1 konnte Chlorogensäure mit einer Ausbeute von 25 mg und einer chromatographischen Reinheit von 70% [HPLC, 280 nm] und aus Fraktion 2 das Cumaroyl-Iridoid mit einer Ausbeute von 107 mg und einer Reinheit von 93,8% [HPLC, 280 nm] isoliert werden.

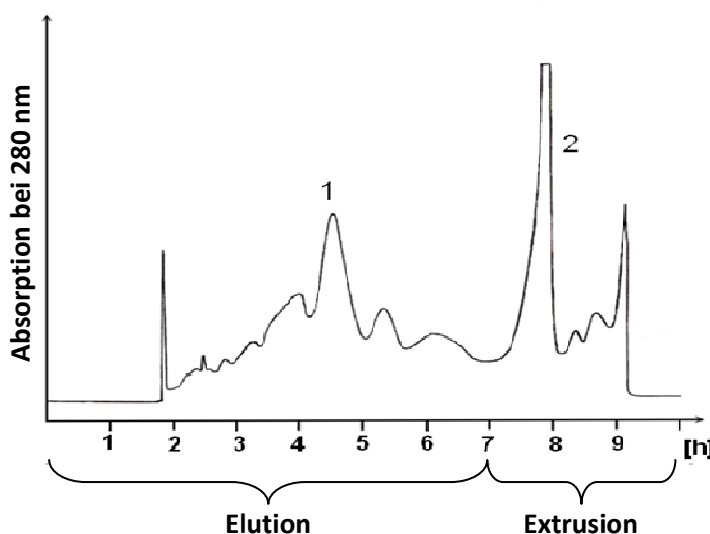


Abb. 3.47: HSCCC-Chromatogramm der Trennung von 630 mg der LSRCCC-Coilfraktion I.

Durch präparative HPLC wurden aus 50 mg der HSCCC-Fraktion 2, 25 mg des Cumaroyl-Iridoids mit einer chromatographischen Reinheit (280 nm) von 99,6% isoliert. Mittels der durch ¹H-NMR sowie ¹³C-NMR-Spektroskopie gewonnenen und in Tab. 3.12 aufgeführten Daten sowie der 2D-Experimente H,H-COSY, HMBC und HSQC, ließ sich die in Abb. 3.48 gezeigte Struktur der Verbindung 10-*p-trans*-Cumaroyl-1S-Monotropein ermitteln.

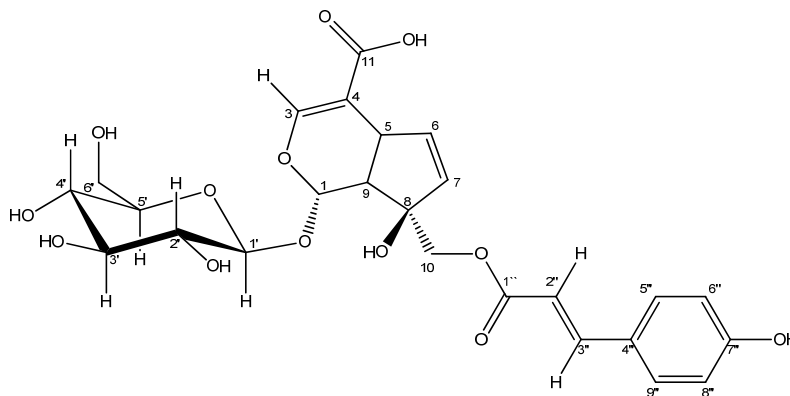


Abb. 3.48: Chemische Struktur von 10-*p-trans*-Cumaroyl-15-Monotropein.

Tab. 3.12: ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Daten von 10-*p-trans*-Cumaroyl-15-Monotropein. Spektren wurden bei 600 MHz (^1H -NMR) und 150 MHz (^{13}C -NMR) in CD_3OD aufgenommen.

C/H	δ_{H} [ppm]	δ_{C} [ppm]
1	5.62 (d, 1H, $J=2.3\text{Hz}$, H1)	94,7 (C1)
3	7.33 (d, 1H, $J=1.4\text{Hz}$, H3)	152,5 (C3)
4		111,0 (C4)
5	3.50 (ddd, 1H, $J=1.7\text{Hz}$, $J=4.1\text{Hz}$, $J=8.7\text{Hz}$, H5)	39,1 (C5)
6	6.18 (dd, 1H, $J=2.6\text{Hz}$, $J=5.7\text{Hz}$, H6)	138,5 (C6)
7	5.61 (dd, 1H, $J=1.8\text{Hz}$, $J=5.7\text{Hz}$, H7)	133,1 (C7)
8		84,4 (C8)
9	2.63 (dd, 1H, $J=2.3\text{Hz}$, $J=8.7\text{Hz}$, H9)	46,4 (C9)
10	4.11 (d, 1H, $J=11.1\text{Hz}$, H10a) 4.23 (d, 1H, $J=11.1\text{Hz}$, H10b)	70,0 (C10)
11		170,5 (C11)
1'	4.58 (d, 1H, $J=7.9\text{Hz}$, H1')	99,9 (C1')
2'	3.12 (dd, 1H, $J=8.0\text{Hz}$, $J=9.1\text{Hz}$, H2')	74,6 (C2')
3'	3.27 (t, 1H, $J=9.0\text{Hz}$, H3')	78,0 (C3')
4'	3.21 (m (overlapped), 2H, H4'/H5')	70,0 (C10)
5'	3.21 (m (overlapped), 2H, H4'/H5')	78,3 (C5')
6'	3.55 (dd, 1H, $J=5.1\text{Hz}$, $J=12.0\text{Hz}$, H6a') 3.75 (dd, 1H, $J=1.6\text{Hz}$, $J=11.9\text{Hz}$, H6b')	62,5 (C6')
1''		169,0 (C1'')
2''	6.28 (d, 1H, $J=15.9\text{Hz}$, H2'')	114,9 (C2'')
3''	7.55 (d, 1H, $J=15.9\text{Hz}$, H3'')	147,1 (C3'')
4''		127,2 (C4'')
5''	7.39 (m, 2H, H5''/H9'')	131,4 (C5''/C9'')
6''	6.71 (m, 2H, H6''/H8'')	116,9 (C6''/C8'')
7''		161,4 (C7'')
8''	6.71 (m, 2H, H6''/H8'')	116,9 (C6''/C8'')
9''	7.39 (m, 2H, H5''/H9'')	131,4 (C5''/C9'')

Anhand der Signale im ^1H -NMR- und im ^{13}C -NMR-Spektrum (Tab. 3.12) ließen sich die Glucose und die *p*-Cumarsäure, als Teilstrukturen der Verbindung, schnell identifizieren. Die beiden Dubletts bei ppm 7.55 (d, 1H, $J=15.9\text{Hz}$, H3'') und ppm 6.28 (d, 1H, $J=15.9\text{Hz}$, H2'') im ^1H -NMR-Spektrum, mit Kopplungskonstanten von jeweils 15.9 Hz, bestätigten die *trans*-Konfiguration der Doppelbindung der *p*-Cumarsäure.

Die Kohlenstoffatome C4, C8, C11, C1'', C4'' und C7'' zeigten im HSCQ-Experiment (Abb. 3.49) keine Korrelation mit Protonen. Durch die sehr weit ins tiefe Feld verschobenen Signale des C1''-Kohlenstoffatoms bei ppm 169,0 und des C11-Kohlenstoffatoms bei ppm 170,5 konnte die Carbonsäurefunktion (C11) bzw. die Carbonsäureester-

bindung (C1'') bestätigt werden, letztere auch aufgrund der chemischen Verschiebung des benachbarten und sp^3 -hybridisierten C10-Kohlenstoffatoms bei ppm 70,0 im ^{13}C -NMR-Spektrum. Dieses zeigt im HSQC-Experiment Korrelationen mit seinen beiden im ^1H -NMR-Spektrum nicht äquivalenten Protonen bei ppm 4.11 (d, 1H, $J=11.1\text{Hz}$, H10a) und ppm 4.23 (d, 1H, $J=11.1\text{Hz}$, H10b).

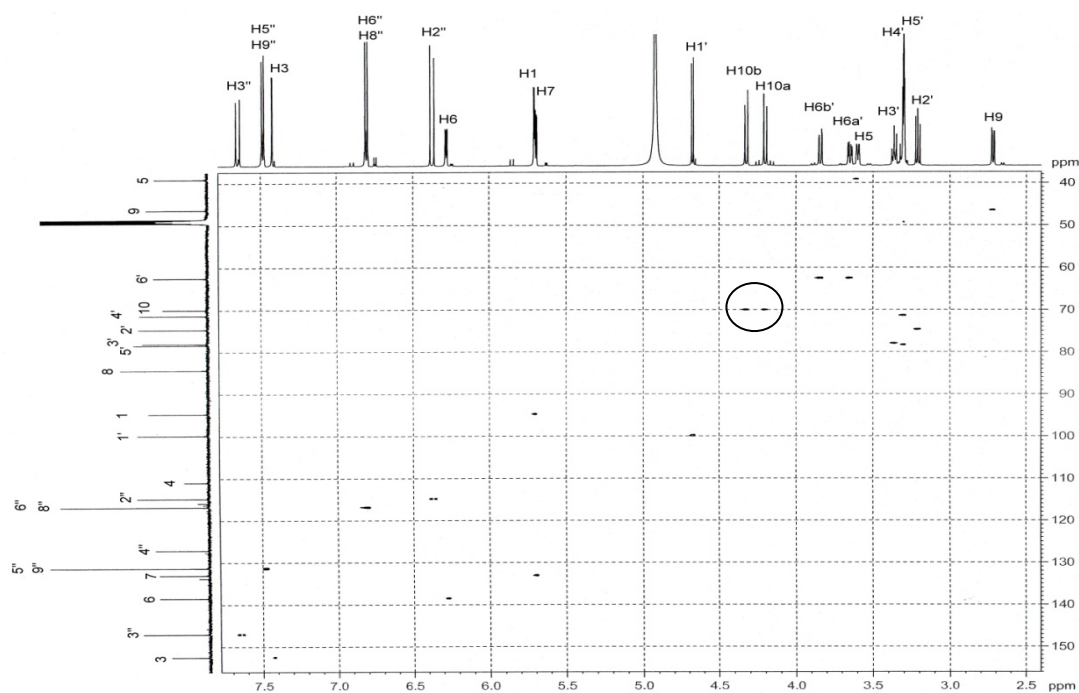


Abb. 3.49: HSQC-Spektrum der Verbindung 10-*p-trans*-Cumaroyl-1S-Monotropein.

Außerdem zeigen die beiden Protonen dieser Methylengruppe Korrelationen mit den benachbarten Kohlenstoffatomen C8, C9, C7 und C1'' im HMBC-Experiment als zusätzliche Bestätigung der Carbonsäureesterbindung (siehe Abb. 3.50). Die Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen C3 und C4 kann durch das olefinische Proton bei ppm 7.33 (d, 1H, $J=1.4\text{Hz}$, H3) bestätigt werden. Dieses zeigt im HMBC-Spektrum Korrelationen mit den Kohlenstoffatomen C1, C4, C5 und C11.

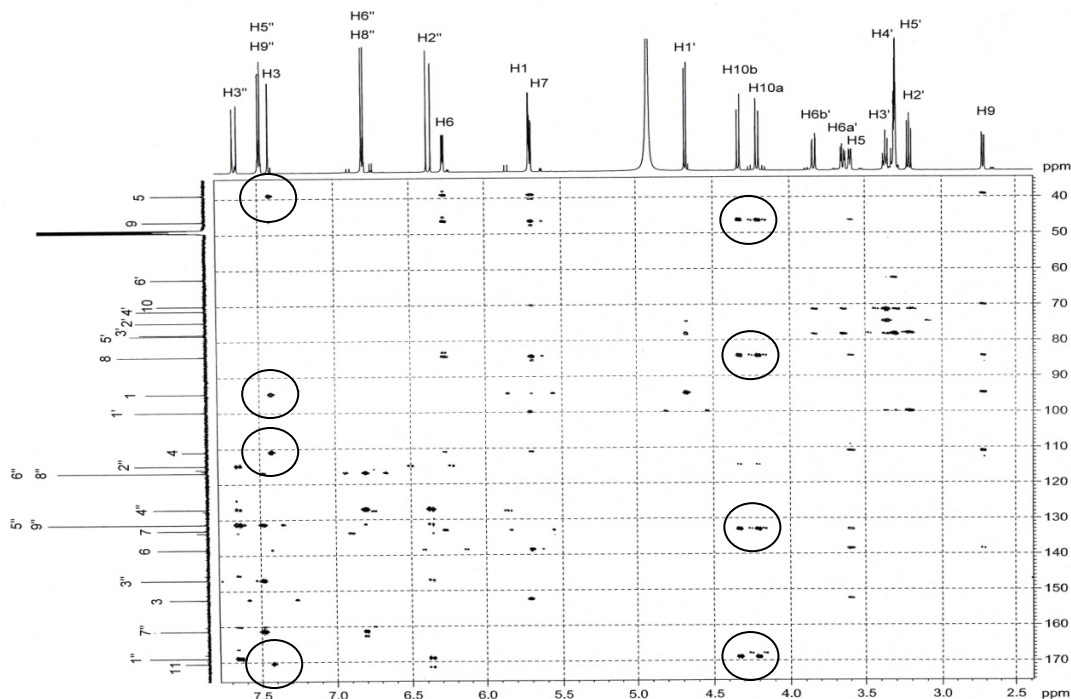


Abb. 3.50: HMBC-Spektrum der Verbindung 10-*p-trans*-Cumaroyl-1S-Monotropein.

Eine weitere olefinische Doppelbindung zwischen den zwei Kohlenstoffatomen C7 bei ppm 133,1 und C6 bei ppm 138,5 wurde durch die Signale im ^1H -NMR-Spektrum bei ppm 6.18 (dd, 1H, $J=2.6\text{Hz}$, $J=5.7\text{Hz}$, H6) und ppm 5.61 (dd, 1H, $J=1.8\text{Hz}$, $J=5.7\text{Hz}$, H7) sowie die entsprechenden Korrelationen im HMQC- und HMBC-Spektrum bestätigt. Damit war sichergestellt, dass es sich um einen Ester der *p*-Cumarsäure mit einem glykosylierten Iridoid handeln müsse.

Die Stereochemie dieser Verbindung könnte durch die in Tab. 3.12 gezeigten ^{13}C -NMR-Signale der Verbindung und einen Vergleich mit in der Literatur gefundenen Daten aufgeklärt werden. So zeigten Chaudhuri et al. (1980), dass es bei den beiden C8-Epimeren Monotropein und Gardenosid (siehe Abb. 3.51) zu einem Unterschied der chemischen Verschiebung des benachbarten C9-Kohlenstoffatoms von 5-7 ppm kommt. Die chemische Verschiebung des Signals dieses Kohlenstoffatoms liegt beim Monotropein bei ppm 45,4 beim Gardenosid dagegen bei ppm 52,4.

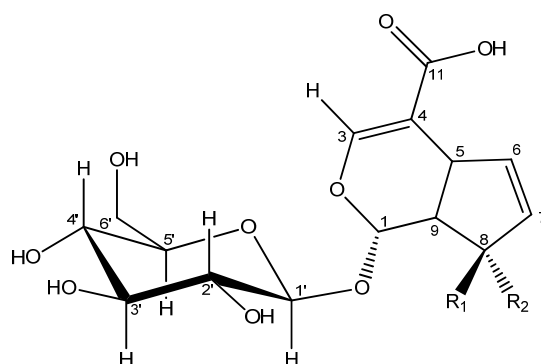


Abb. 3.51: Chemische Struktur von Monotropein ($R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{CH}_2\text{OH}$) und Gardenosid ($R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$, $R_2 = \text{OH}$) nach Chaudhuri et al. (1980) und Choi et al. (2005).

Weiterhin zeigt sich ein Einfluss auf die chemische Verschiebung der Kohlenstoffatome C6 und C7. Während es beim Monotropein in der Literaturstelle einen Unterschied der chemischen Verschiebungen von 4-5 ppm zwischen diesen Kohlenstoffatomen gibt (C6 = ppm 137,5; C7 = ppm 133,6), ist dieser Unterschied beim Gardenosid (C6 = ppm 135,8; C7 = ppm 135,9) nicht gegeben. Die ermittelten ^{13}C -NMR Daten zeigten eine große Übereinstimmung mit den für Monotropein gefundenen ^{13}C -NMR Daten (Chaudhuri et al., 1980). Auch die Daten der nach Choi et al. (2005) durchgeführten ^1H -NMR und ^{13}C -NMR-Messungen von 1S-Monotropein stimmten für diesen Teil des Moleküls sehr gut mit den in Tab. 3.12 gezeigten ^1H -NMR und ^{13}C -NMR Daten überein. Hinzu kommt, dass 10-*p-trans*-Cumaroyl-1S-monotropein (Vaccinosid) schon wie eingangs erwähnt aus einer Art der Gattung Heidelbeeren (Sakakibara et al., 1973) isoliert werden konnte und sowohl Vaccinosid als auch Andromedosid (10-*p-cis*-Cumaroyl-1S-monotropein) aus weiteren Heidekrautgewächsen (Ericaceae) bekannt sind (Chung et al., 1980). Somit konnte durch die NMR-Analytik mit den entsprechenden 2D-Experimenten sowie durch den Vergleich mit in der Literatur gefundenen NMR-Daten die Stereochemie vollständig geklärt, die Verbindung zweifelsfrei als 10-*p-trans*-Cumaroyl-1S-Monotropein (Vaccinosid) identifiziert und erstmals aus Heidelbeeren bzw. einem Heidelbeerextrakt durch die Kombination von LSRCCC und HSCCC isoliert werden.

3.5 Entwicklung einer membranchromatographischen Methode zur Isolierung von Anthocyanen

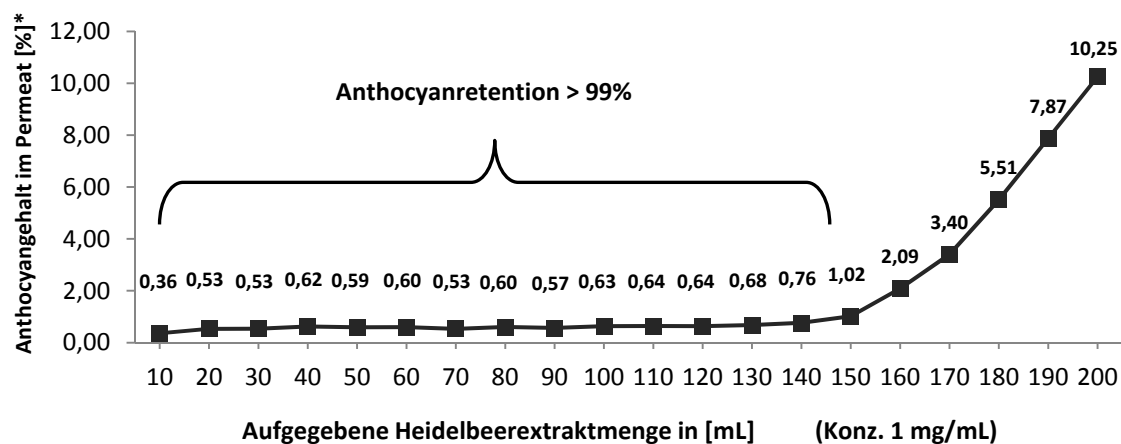
Da es bislang an geeigneten Methoden fehlte, um Anthocyane vollständig aus Naturstoffextrakten zu isolieren, wurde am Beispiel eines Heidelbeerextraktes nach einer Möglichkeit gesucht, die Anthocyane von den Copigmenten und den restlichen Extraktbestandteilen selektiv abzutrennen. Zwar konnte bereits im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Trennung eines Heidelbeerextraktes mittels HSCCC in eine Polymer-, eine Anthocyan- und eine Copigment-Fraktion mittels HSCCC sehr gut funktioniert (siehe Kapitel 3.2.2), jedoch nicht ohne den für diese Trennungen notwendigen Einsatz von perfluorierten Reagenzien. Da jedoch Rückstände von gesundheitsschädlichen perfluorierten Verbindungen die so gewonnenen Fraktionen für *in vitro*-, *in vivo*- oder Humanstudien unbrauchbar machen, musste eine weitere Möglichkeit zur Abtrennung der Anthocyane gefunden werden. Neben dem Verzicht auf gesundheitsschädliche Lösungsmittel und Reagenzien sollte die neue Methode schnell durchführbar, selektiv für die Anthocyane sowie einfach zu handhaben sein. Weiterhin sollte die Methode sehr gut durch Upscaling über den präparativen Maßstab hinaus für industrielle Anwendungen nutzbar sein. Mögliche Anwendungen wären hier zum Beispiel die Anreicherung und Gewinnung von Anthocyanen zur Einbringung in diverse Verkapselungssysteme (FEI), beispielsweise zur Verwendung der isolierten Wirkstoffe in Nahrungsergänzungsmitteln. Die selektive Abtrennung der Anthocyane gelang schließlich mittels Membranchromatographie an Sartobind® S Membranadsorbern der Firma Sartorius AG aus Göttingen. Diese Adsorber bestehen aus Hydrosart®, einer Cellulose, die durch sogenannte X-Linker gegen Säuren und Laugen stabilisiert, und an der Oberfläche mit negativ geladenen Sulfonsäuregruppen modifiziert wird. Die Membran ist mit einem Porendurchmesser von 0,45 bis 3 µm netzartig strukturiert und eignet sich nach Ansäuern von anthocyanhaltigen Extrakten aufgrund der negativ geladenen Oberfläche zur Adsorption der positiv geladenen Flavylumkationen (vergl. Kapitel 2.3.4).

3.5.1 Methodenentwicklung im semipräparativen Maßstab

Für die ersten Vorversuche zur Isolierung und Abtrennung der Anthocyane von den Copigmenten aus Heidelbeerextrakt wurden Membranadsorbereinheiten des Typs Sartobind S75 der Firma Sartorius eingesetzt. Die Bezeichnung S steht für die Sulfonsäuregruppen der modifizierten Membranoberfläche, die Zahl 75 für das Ausmaß dieser Oberfläche von 75 cm² (Infos und Herstellerangaben zu den Adsorbern siehe Kapitel 5.3.9.2). Diese Membranadsorbertypen haben sich u. a. bereits für die Aufreinigung und Isolierung von Proteinen bewährt (Ghosh, 2002; Ohlrogge und Ebert, 2006; Plate et al., 2006). Für die Isolierung der Anthocyane war es erforderlich, diese zunächst durch Ansäuern der Extraktlösung in positiv geladene Flavylumkationen zu überführen. Die Flavylumkationen konnten anschließend nach Aufgabe der Extraktlösung an der Membranoberfläche adsorbiert und selektiv von den übrigen ungeladenen Extraktbestandteilen abgetrennt werden, da diese ungehindert die netzartige Struktur des Membranadsorbers passieren. So konnte, wie im Folgenden durch verschiedene Optimierungsschritte gezeigt, eine membranchromatographische Methode zur Isolierung von Anthocyanen im semipräparativen Maßstab entwickelt werden. Zur Erfassung der Retention sowie der Bindungskapazitäten für die Anthocyane wurden zunächst einige Retentionsstudien mit den S75 Membranadsorbereinheiten durchgeführt. Zur Probenaufgabe bewährte sich eine 30 mL Einwegspritze, anhand derer die

Probenlösungen von Hand mit einer Flussrate von ca. 10 mL/min auf die Adsorbereinheit aufgegeben wurden. Zuvor wurde der Membranadsorber allerdings mit 60 mL 1 N NaOH gereinigt und anschließend mit 60 mL 0,01 N HCl equilibriert. Andernfalls zeigte die Adsorbereinheit in den durchgeführten Versuchsreihen (auch im fabrikneuen Zustand) nicht die maximale Adsorptionsleistung. Dies liegt an der zur Stabilisierung vorgenommenen Lagerung in Glycerol, das zunächst vor der Trennung von der Membranoberfläche entfernt werden muss.

In einer ersten Versuchsreihe wurden wässrige Extraktlösungen gewählt, um die Eignung der Adsorber zur Isolierung von Anthocyanen aus wässrigen Lösungen wie z. B. Säften zu testen. Dazu wurden Lösungen des kommerziellen Heidelbeerextraktes der Konzentration 1 g/L in wässriger HCl mit verschiedenen pH-Werten hergestellt, vorfiltriert und anschließend mit einem Fluss von 10 mL/min durch den Adsorber gedrückt. In Abständen von 10 mL wurde der Anthocyan-, der Chlorogensäure- (stellvertretend für die polareren Copigmente im Extrakt) und der Quercetingehalt (stellvertretend für die unpolaren Copigmente im Extrakt) in dem aus dem Adsorber austretenden Permeat mittels HPLC bestimmt. Anschließend wurden die Konzentrationen dieser Verbindungen in der Permeatfraktion mit der Konzentration in der Ausgangsextraktlösung verglichen. Aus der Differenz zwischen Extraktlösung und Permeat ergab sich der prozentuale vom Adsorber retardierte Anteil der jeweiligen Verbindung. Die genaue Vorgehensweise zur Durchführung dieser Retentionsstudien findet sich im Kapitel 5.5.2. Ein pH-Wert von 2 zeigte sich am geeignetsten im Hinblick auf die Optimierung der Anthocyanretention. Dieser pH-Wert ist für die Membran gerade noch gut verträglich, während aufgrund der Gleichgewichtsreaktion zwischen der farblosen Carbinolbase (pH 4,5) und dem roten Flavylumkation (pH ≤ 1) schon ein Großteil der Anthocyane als positiv geladene Flavylumkationen vorliegt (vergl. Kapitel 2.2.2.2). So wurde bei einem pH-Wert von 2 nicht nur die beste Retention, sondern auch eine ausreichende Stabilität der Anthocyane in der Lösung erreicht (vergl. ebenfalls Kapitel 2.2.2.2). Die Membranchromatographie von Säften mit geringeren pH-Werten, bei Heidelbeersäften um pH 3,5 (Azar et al., 1987), ist allerdings bei etwas geringerer Retention der Anthocyane ebenfalls durchführbar (siehe Kapitel 3.5.4.2), wobei die Säfte zur Erhöhung des pH-Wertes und somit der Retention ebenfalls mit HCl angesäuert werden können. Die Abb. 3.52 zeigt die Anthocyangehalte in dem aus dem Adsorber austretenden Permeat der in wässriger HCl (pH 2) gelösten Extraktprobe.

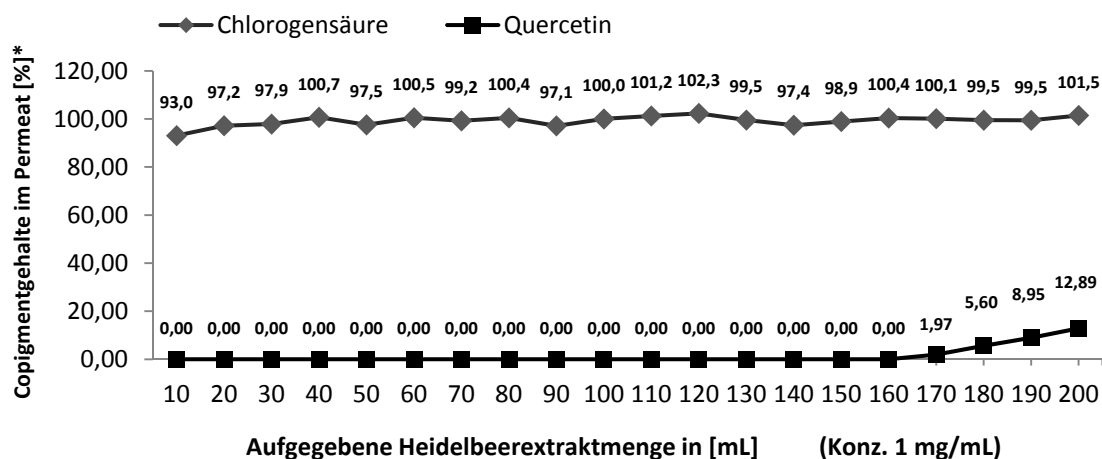


* bezogen auf die Ausgangskonzentration

Abb. 3.52: Anthocyanretention der Sartobind S75 Membranadsorber-Einheiten. Heidelbeerextrakt gelöst in wässriger HCl (pH 2).

Bis zu einem Beladungsvolumen von 140 mL beträgt die Anthocyankonzentration im austretenden Permeat weniger als 1%, bezogen auf die Ausgangskonzentration der Extraktlösung. Das heißt, die Adsorbereinheit zeigt bis zu diesem Zeitpunkt eine Anthocyanretention von über 99%. Danach erreicht der Adsorber langsam seine Kapazitätsgrenze und die Anthocyankonzentration im Permeat steigt an. Bei 200 mL, entsprechend einer aufgegebenen Extraktmenge von 200 mg bzw. 55 mg Heidelbeer-Anthocyane (Extraktgehalt 27,5%), wird der 10%-Wert erreicht, das heißt, es gelangen bereits 10% der aufgegebenen Anthocyane in das austretende Permeat und nur noch 90% der Anthocyane werden zu diesem Zeitpunkt retardiert. Daraus ergibt sich eine dynamische Bindungskapazität für die Anthocyane von 55 mg auf der Adsorbereinheit bzw. 26,7 mg/mL Membranzvolumen (36,4 cm² Membranoberfläche entsprechen 1 mL Membranzvolumen), bei einer Flussrate von 10 mL/min im wässrigen Extraktlösungsmittel. Höhere Flussraten lassen sich aufgrund des Gegendruckes mit der Spritze nur sehr schlecht realisieren, während niedrigere Flussraten zu keiner signifikanten Erhöhung der dynamischen Bindungskapazität führten.

Auch die Chlorogensäure- und Quercetingehalte im Permeat wurden mittels HPLC bestimmt. Abb. 3.53 zeigt die im Rahmen dieser Retentionsstudie ermittelten Werte. Angestrebt war eine vollständige Durchlässigkeit der netzartig strukturierten Membran für ungeladene Copigmente und Extraktbestandteile. Es zeigte sich allerdings, dass der Membranadsorber zwar zu 100% durchlässig für Chlorogensäure ist, jedoch bis zum Erreichen des Anthocyandurchbruches ab 160 mL kein Quercetin im Permeat nachgewiesen werden konnte. Aufgrund seines unpolaren Charakters wird das Quercetin wahrscheinlich durch Van-der-Vaals-Kräfte auf dem Membranadsorber gebunden und besitzt eine höhere Affinität zur Celluloseoberfläche der Membran als zum wässrigen Extraktlösungsmittel.

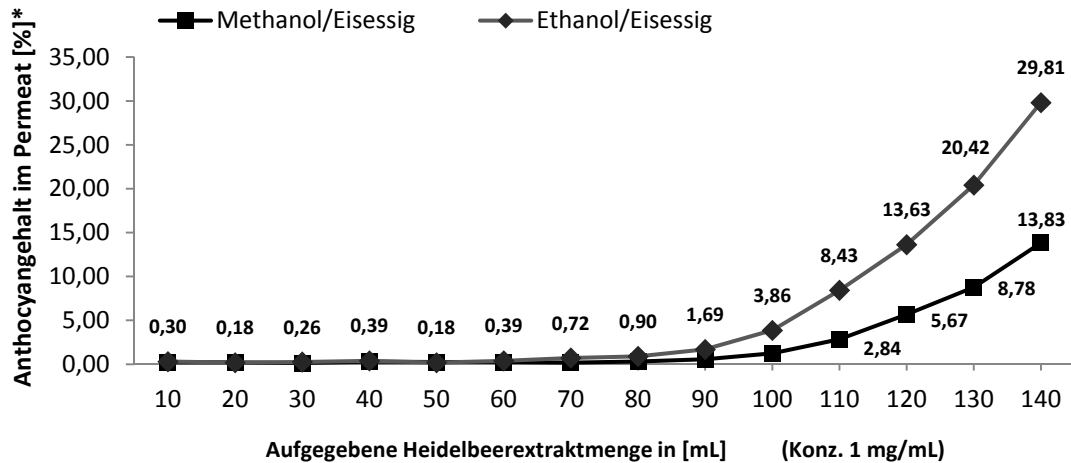


* bezogen auf die Ausgangskonzentration

Abb. 3.53: Chlorogensäure- und Quercetinretention der Sartobind S75 Membranadsorber-Einheiten. Heidelbeerextrakt gelöst in wässriger HCl (pH 2).

Abhilfe schafft hier die Verwendung von unpolaren Lösungsmitteln wie Methanol/Eisessig bzw. Ethanol/Eisessig im Verhältnis 19:1 (v/v) als Extraktlösungsmittel. Das Adsorptionsvermögen hochmolekularer Polysaccharide wie Dextrane oder Cellulose für Quercetin aus wässrigen Lösungen ist bekannt und wird bereits zur Aufreinigung und Gewinnung genutzt. Auch hier dienen methanolische oder ethanolische Lösungen zur Elution des Quercetins (Wedepohl und Schwedt, 1987; Sikorska und Matlawska, 2000).

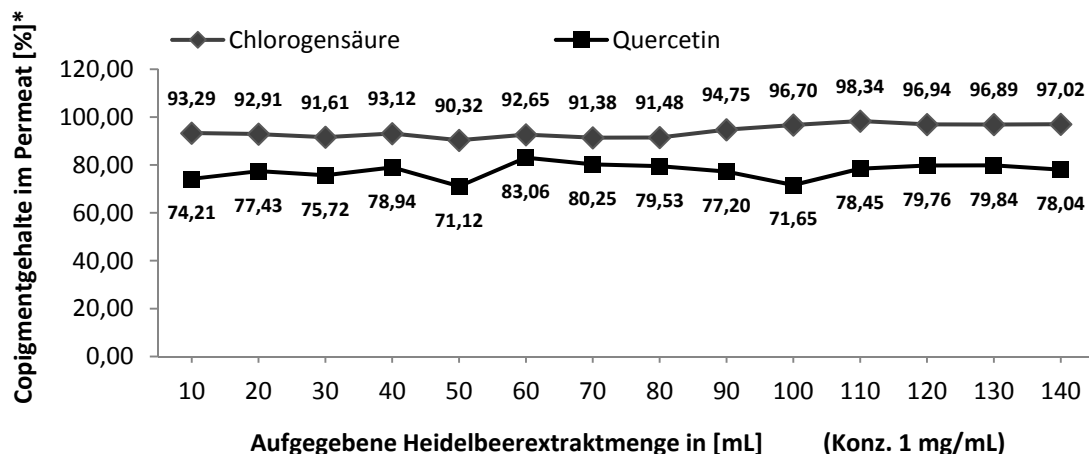
Zunächst wurde allerdings die Retention der Anthocyane in den genannten unpolaren Extraktlösungsmitteln untersucht. Abb. 3.54 zeigt den Vergleich der Anthocyanretention der Sartobind S75 Membranadsorbereinheit bei Verwendung von Extraktlösungen der Konzentration 1 mg/mL.



* bezogen auf die Ausgangskonzentration

Abb. 3.54: Anthocyanretention der Sartobind S75 Membranadsorber-Einheiten. Heidelbeerextrakt gelöst in Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) und Ethanol/Eisessig, 19:1 (v/v).

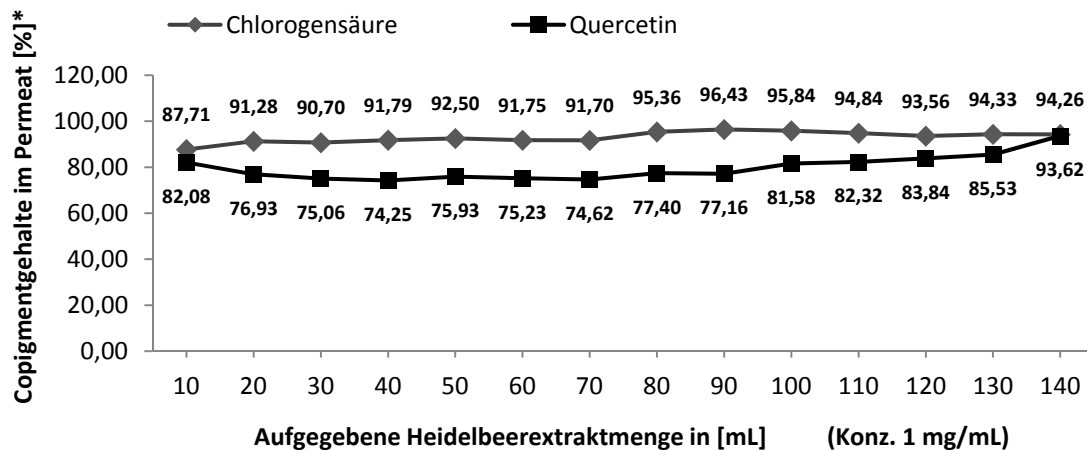
Im Vergleich zur wässrigen Extraktlösung wird hier der Durchbruch der Anthocyane sowie der 10% Wert etwas früher erreicht. Im Fall von Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v) bei 110 mL, mit Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) als Extraktlösungsmittel bei 130 mL Lösungsvolumen. Damit fällt die dynamische Bindungskapazität der Adsorbereinheit für die Anthocyane bei einem Fluss von 10 mL/min mit 35,9 mg (in Methanol) bzw. 30,4 mg (in Ethanol) gegenüber der wässrigen Extraktlösung (55 mg) geringer aus. Allerdings beträgt auch hier die Anthocyanretention bis zu einem Aufgabevolumen von 100 mL über 98%.



* bezogen auf die Ausgangskonzentration

Abb. 3.55: Chlorogensäure- und Quercetinretention der Sartobind S75 Membranadsorber-Einheiten. Heidelbeerextrakt gelöst in Methanol/Eisessig, 19:1 (v/v).

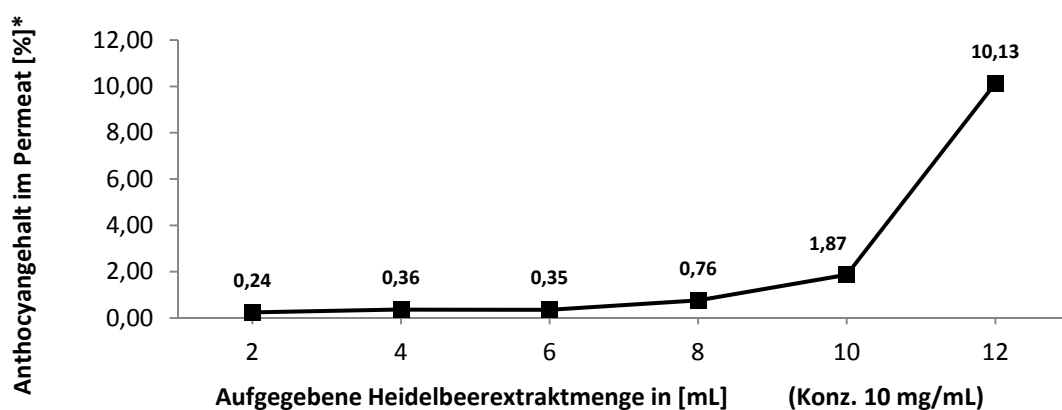
Deutliche Unterschiede zur wässrigen Extraktlösung zeigte die Betrachtung der Retention der Copigmente. Während die Chlorogensäure in Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) (Abb. 3.55) bzw. Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v) (Abb. 3.56) zu ca. 5 bis 10% zurückgehalten wird, zeigte sich für das Quercetin nur noch eine Retention zwischen 15 bis 25%, während 75 bis 85% im Permeat nachweisbar waren. Somit wird der Großteil an Copigmenten einschließlich des Quercetins bei Verwendung methanolischer bzw. ethanolischer Extraktlösungen nicht retardiert und gelangt wie angestrebt in die Permeatfraktion.



* bezogen auf die Ausgangskonzentration

Abb. 3.56: Chlorogensäure- und Quercetinretention der Sartobind S75 Membranadsorber-Einheiten. Heidelbeereextrakt gelöst in Ethanol/Eisessig, 19:1 (v/v).

Ein weiterer Vorteil methanolischer bzw. ethanolischer gegenüber wässrigen Lösungen ist die bessere Löslichkeit der Extrakte. Dadurch können Extraktlösungen der Konzentration von bis zu 10 g/L realisiert und auf den Adsorber aufgegeben werden. Abb. 3.57 zeigt die Anthocyanretention einer solchen 10fach konzentrierteren Extraktlösung (10 g/L) in Methanol/Eisessig 19:1 (v/v).



* bezogen auf die Ausgangskonzentration

Abb. 3.57: Anthocyanretention der Sartobind S75 Membranadsorber-Einheiten. Heidelbeereextrakt gelöst in Methanol/Eisessig, 19:1 (v/v).

Auch hier entspricht die Anthocyanretention bis zu einem Volumen von 10 mL (entsprechend 100 mg aufgegebener Extraktmenge) über 98% (nur max. 2% der Anthocyane sind im Permeat nachzuweisen). Es zeigt sich somit, dass die Adsorptionsleistung des Adsorbers weitestgehend

unabhängig von der Extraktkonzentration ist und hauptsächlich durch die maximale bzw. dynamische Bindungskapazität des Adsorbers begrenzt wird. Letztere beträgt aufgrund des 10%-Wertes bei 12 mL aufgegebenem Extraktvolumen 33,1 mg an Anthocyanen. Für die wässrigen Extraktlösungen spricht eine bessere dynamische Bindungskapazität der Anthocyane. Dagegen spricht allerdings eine bis zu 100%ige Retention der lipophileren Copigmente. Mit den lipophileren Extraktlösungsmitteln wird zwar eine geringere dynamische Bindungskapazität der Anthocyane erzielt, allerdings überwiegen hier die Vorteile der sehr guten Durchlässigkeit für sämtliche Copigmente, einschließlich der lipophileren wie Quercetin, sowie die Möglichkeit zur Aufgabe konzentrierterer Extraktlösungen. Ein weiterer Vorteil ist die Kombinationsmöglichkeit der Polyphenolanreicherung mittels Amberlite® XAD-7 und der Membranchromatographie. So können die während der Anreicherung am XAD-7 Material adsorbierten Polyphenole zunächst mit Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) bzw. Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v) von der Säule eluiert und diese Lösung direkt zur membranchromatographischen Trennung von Anthocyanen und Copigmenten eingesetzt werden. Dabei sind Methanol und Ethanol jederzeit austauschbar. Zur Gewinnung von Fraktionen zu analytischen oder präparativen Zwecken, wie z. B. Isolierung und Strukturaufklärung, kann Methanol und für die Gewinnung von Fraktionen für *in vitro*-, *in vivo*- oder Humanstudien, sowie zu Verkapselungszwecken und Einsatz in Nahrungsergänzungsmitteln, kann das teurere aber weniger gesundheitsschädliche Ethanol verwendet werden. Für die industrielle Nutzung wäre die Membranchromatographie zur Anreicherung von Anthocyanen aus wässrigen Lösungen, z. B. aus Säften, sicherlich auch von Vorteil. Nachteilig bei wässrigen Lösungen könnten sich dabei jedoch wasserlösliche Schleimstoffe auswirken, welche bei der Chromatographie zu hohen Gegendrücken und zum Verstopfen der Membran führen können. Dies macht sich bei der Membranchromatographie aus wässrigen Lösungen trotz sorgfältiger Vorfiltration auch bemerkbar, denn bei der Probenaufgabe mittels Spritze muss mit deutlich mehr Druck gearbeitet werden. So sind im industriellen Prozess sicherlich einige vorgeschaltete Filtrationsschritte obligatorisch. Die methanolischen oder ethanolischen Extraktlösungen ließen sich dagegen besser filtrieren und auch unter geringerem Gegendruck auf den Adsorber aufgeben. Für die vollständige Fraktionierung von Anthocyanen und Copigmenten wäre die membranchromatographische Trennung aus wässrigen Lösungen dagegen, aufgrund der vollständigen Quercetinretention, undenkbar. Anders würde sich dies darstellen, wenn die retardierten Copigmente durch einen Spülschritt vor der Elution der Anthocyane entfernt werden könnten. Deshalb wurde ein Spülschritt mit Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) bzw. Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v) durchgeführt, um die auf dem Membranadsorber retardierten Copigmente zu entfernen. Nach der Probenaufgabe der wässrigen Extraktlösungen konnte durch Spülen mit 60 mL Methanol/Eisessig- bzw. Ethanol/Eisessig-Lösung das retardierte Quercetin vollständig eliminiert und in der Spüllösung nachgewiesen werden. Im Anschluss an die Membranchromatographie methanolischer bzw. ethanolischer Extraktlösungen reichte bereits ein Spülvolumen von 30 mL des jeweiligen Extraktlösungsmittels aus, um die restlichen retardierten Copigmente vor der Elution der Anthocyane von der Adsorbereinheit zu entfernen.

Zur Elution der retardierten Anthocyane wurden verschiedene Salzlösungen getestet. Als am besten geeignet stellte sich eine 0,1 M wässrige NaCl-Lösung, gemischt im Verhältnis 1:1 (v/v) mit Methanol oder Ethanol heraus. Rein wässrige NaCl-Lösungen zeigten dagegen nur eine sehr geringe Elutionskraft. Die Elutionskraft der Lösung ließ sich sehr gut über die Salzkonzentration einstellen. So konnten mit 80 mL einer 0,1 M NaCl-Lösung oder mit 8 mL einer 1M NaCl-Lösung im Gemisch mit Methanol bzw. Ethanol sämtliche Anthocyane vom Adsorber eluiert werden. Salzlösungen mit 2-wertigen Kationen wie z. B. Magnesiumcitrat- ($\text{Mg}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \times 9\text{H}_2\text{O}$) oder Magnesiumsulfat-Lösungen (MgSO_4) zeigten bei gleicher molarer Konzentration eine deutlich geringere Elutionskraft. Dies ist auch nicht verwunderlich, da zweiwertige und dreiwertige Kationen gegenüber den Anthocyanen

komplexbildende Eigenschaften besitzen (vergl. Kapitel 2.2.2.2). Dies führt wahrscheinlich zu zwei Effekten. Erstens wird die, aufgrund des Zusammenhanges von Größe, Hydrathülle, Polarisierbarkeit und Ladung, für gewöhnlich höhere Elutionskraft der Mg^{2+} -Ionen gegenüber den Na^+ -Ionen durch die Komplexbildung der Mg^{2+} -Ionen mit Anthocyanen herabgesetzt. Zweitens tauschen die Mg^{2+} -Ionen die Anthocyane wahrscheinlich nicht nur aus, sondern binden sie danach weiterhin über Komplexe an die Membranoberfläche. Diese Effekte würden die schlechtere Elutionskraft gegenüber den 1-wertigen Salzlösungen erklären. Salze mit dreiwertigen Kationen besitzen noch stärkere komplexbildende Eigenschaften und konnten zur Elution der Anthocyane ebenfalls nicht verwendet werden, zumal sie sich aufgrund der ergebenden sehr stabilen Komplexe anschließend auch nicht mehr vollständig aus der Anthocyanfraktion entfernen lassen. Einwertige Salze eigneten sich dagegen deutlich besser zur Elution der Anthocyane und konnten nach Entfernung des Lösungsmittels und Gefriertrocknung vollständig aus der salzhaltigen Anthocyan-Fraktion durch Adsorption der Anthocyane an Amberlite® XAD-7 wieder entfernt werden (siehe Kapitel 5.4.6).

Um den Schritt der Salz Entfernung aus der Anthocyanfraktion zu umgehen, und direkt salzfreie Anthocyanfraktionen zu erhalten, wurde auch die Möglichkeit der Elution mit Ammoniumacetat in Betracht gezogen und versucht, das Ammoniumacetat während des Gefriertrocknungsprozesses durch Sublimation zu eliminieren. Die Abb. 3.58 zeigt die Elutionskurven einer 0,1 M Ammoniumacetatlösung und einer 0,1 M NaCl-Lösung, jeweils gemischt mit Methanol 1:1 (v/v) im Vergleich.

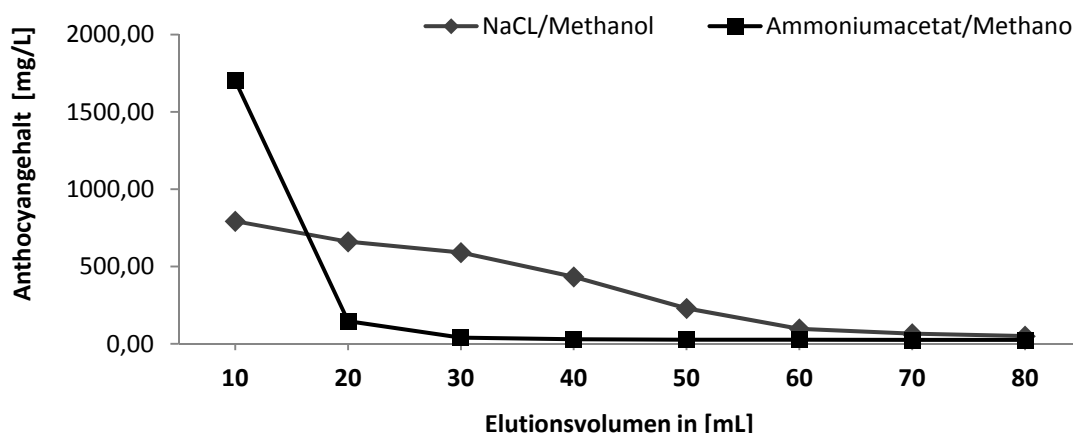


Abb. 3.58: Vergleich der Elutionskurven der Anthocyane mit 0,1 M NaCl- und 0,1 M Ammoniumacetatlösung, jeweils gemischt mit Methanol im Verhältnis 1:1 (v/v), von der Sartobind S75 Membranadsorber-Einheit.

Die Ammoniumacetatlösung zeigt nicht zuletzt auch aufgrund der Pufferwirkung (pH 7) eine stärkere Elutionskraft, da hier die Flavylumkationen über die Carbinolbase zum Teil schon in die negativ geladene ionische Anhydrobase (Flavenolatanion) überführt werden und somit die für die Adsorption verantwortliche positive Ladung verlieren. Nachteilig wirkt sich allerdings die Stabilität der Anthocyane in dieser Lösung aus, da über das Flavenolatanion durch Aufbrechen des Pyranringes sehr schnell das Chalkon gebildet und somit der Abbau der Anthocyane eingeleitet wird (vergl. Kapitel. 2.2.2.2). So wurde nach Entfernen des Lösungsmittels und Gefriertrocknung bereits ein beträchtlicher Anthocyanverlust > 30% festgestellt, der diese Art der Elution unbrauchbar macht. Hinzu kam, dass es nicht gelang, das Ammoniumacetat wie angestrebt durch Sublimation während des Gefriertrocknungsprozesses vollständig zu entfernen. In der NaCl-haltigen Elutionslösung zeigten sich die Anthocyane trotz des neutralen pH-Wertes dagegen stabiler und durch direktes Ansäuern

der Elutionslösung mit konzentrierter Essigsäure auf einen Essigsäuregesamtgehalt von 1% konnte die Stabilität der Anthocyane soweit erhöht werden, dass nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und anschließender Gefriertrocknung kein Verlust an Anthocyanen mittels HPLC nachgewiesen werden konnte. Im Hinblick auf die Kosten, die Stabilität der Anthocyane, die Verwendung der Anthocyanfraktion in Humanstudien, zur Mikroverkapselung und zum Einsatz in Nahrungs- bzw. Nahrungsergänzungsmitteln, zeigte sich der Einsatz der NaCl-haltigen Lösung zur Elution der Anthocyane am geeignetsten, zumal das NaCl anschließend vollständig aus der Anthocyanfraktion entfernt werden konnte. Aufgrund der bisher gezeigten Ergebnisse wurde eine Methode für die Fraktionierung von Extrakten und zur Isolation von Anthocyanen aus Säften entwickelt. Die genaue Durchführung findet sich im Material und Methodenteil im Kapitel 5.4.3.1. Die Abb. 3. 59 zeigt das zugehörige Fließschema zu dieser Methode.

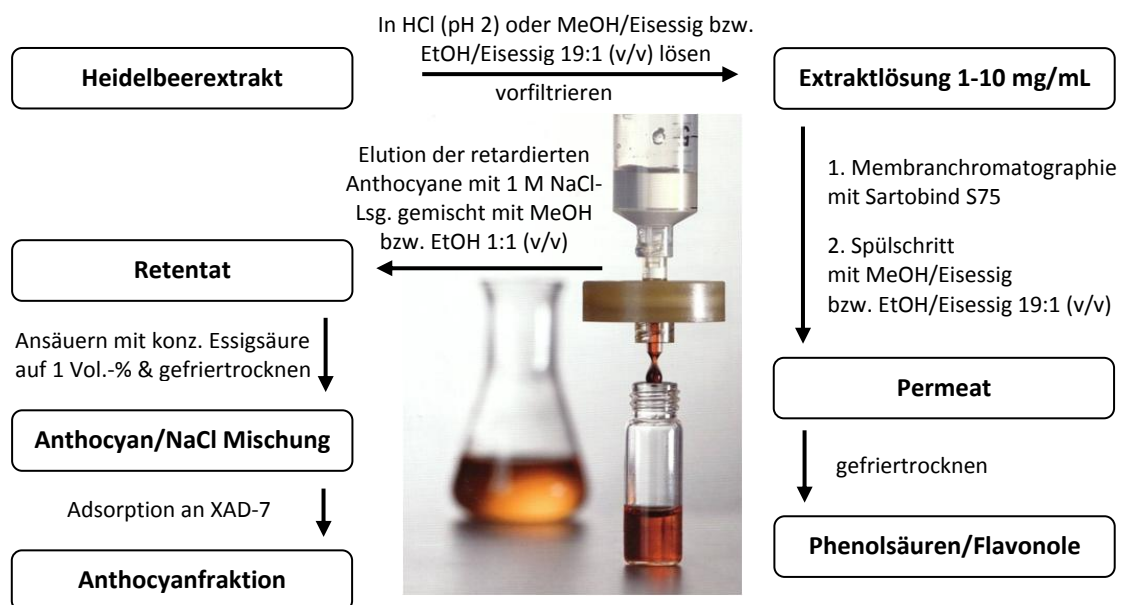


Abb. 3.59: Fließschema zur Membranchromatographie im semipräparativen Maßstab.

Zunächst wird eine Extraktlösung hergestellt, in welcher aufgrund des niedrigen pH-Wertes (pH 2) die Anthocyane zum größten Teil als positiv geladene Flavylumkationen vorliegen. Bei der Beladung des Membranadsorbers mit dieser Lösung werden die Flavylumkationen retardiert, während die ungeladenen Copigmente (Phenolsäuren, Flavonole) sowie die polymeren Bestandteile des Extraktes in die Permeat-Fraktion gelangen. Restliche retardierte Copigmente werden durch einen Spülschritt mit dem Extraktlösungsmittel entfernt, bevor die retardierten Anthocyane mit einer NaCl-haltigen Lösung eluiert werden. Das Eluat wird zwecks Stabilisierung der Anthocyane sofort mit konz. Essigsäure auf einen Essigsäuregesamtgehalt von 1 Vol.-% angesäuert. Nach der Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und Gefriertrocknung wird eine Anthocyan/NaCl-Mischung erhalten, aus welcher das Salz durch Adsorption der Anthocyane an Amberlite® XAD-7 entfernt werden kann. Wird nach dieser im Material und Methodenteil in Kapitel 5.4.3.1 ausführlich beschriebenen Methode vorgegangen, und dabei die Möglichkeit B (Aufgabe der Extraktlösung nur bis zum Durchbruch der Anthocyane) gewählt, so lassen sich polyphenolreiche Naturstoffextrakte sehr gut in eine Anthocyanfraktion und eine Fraktion der Copigmente und ungeladenen Extraktbestandteile fraktionieren. Im Folgenden werden die Anthocyan-, Chlorogensäure- und Quercetingehalte in den nach Anwendung dieser Methode erhaltenen Fraktionen verglichen. Abb. 3.60 zeigt zunächst die Gehalte im Permeat, der Spüllösung und im Eluat nach

Membranchromatographie einer wässrigen Extraktlösung. Wie bei den Retentionsstudien beobachtet, gelangt bei der Membranchromatographie aus wässrigen Lösungen 95,95% der Chlorogensäure in das Permeat, während ein Großteil des Quercetins vom Membranadsorber retardiert wird. Das Quercetin kann jedoch durch einen anschließenden Spülschritt mit 60 mL methanolischer bzw. ethanolischer Spüllösung entfernt werden, ohne dass ein nennenswerter Verlust retardierter Anthocyane stattfindet. So werden mit der Eluatfraktion 98,75% der ursprünglich aufgegebenen Anthocyane in reiner Form erhalten, während Copigmente in dieser Fraktion nicht detektierbar sind.

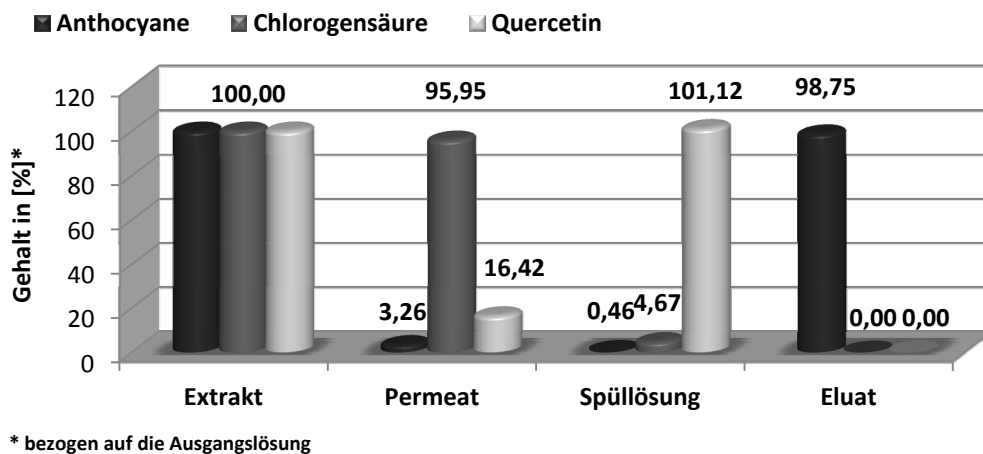


Abb. 3.60: Vergleich der Polyphenolgehalte der Fraktionen des in wässriger HCl (pH 2) mit der Konzentration 1 mg/mL gelösten und mittels Membranchromatographie fraktionierten Heidelbeerextraktes.

Die folgenden Abb. 3.61 und Abb. 3.62 zeigen die Gehalte an Anthocyanen und Copigmenten der Fraktionen, die nach Membranchromatographie des in Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) bzw. Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v) gelösten Extraktes erhalten werden. Es wird deutlich, dass der Großteil an Quercetin und der Chlorogensäure nun in das Permeat gelangt. Zwischen Methanol/Eisessig und Ethanol/Eisessig als Extraktlösungsmittel ergeben sich dabei kaum Unterschiede.

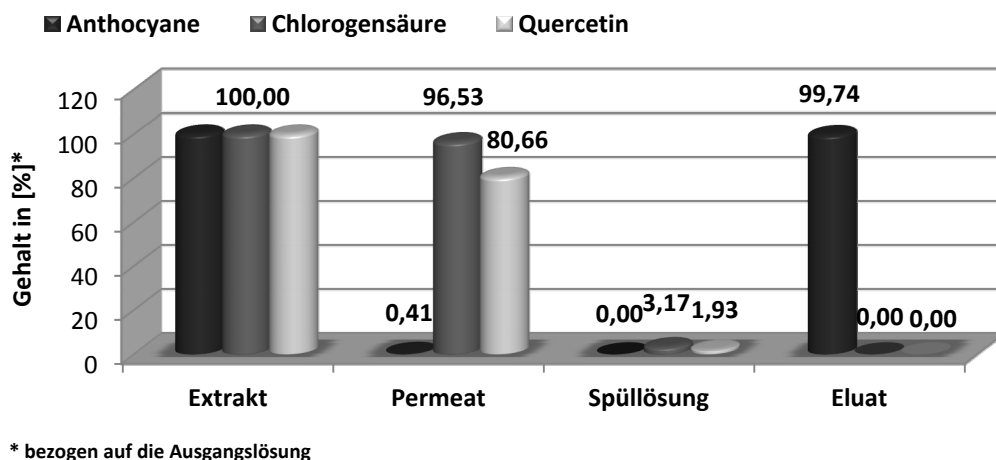


Abb. 3.61: Vergleich der Polyphenolgehalte der Fraktionen des in Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) mit der Konzentration 1 mg/mL gelösten und mittels Membranchromatographie fraktionierten Heidelbeerextraktes.

So gelangen bei dem in Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) gelösten Extrakt 96,53% der Ausgangskonzentration an Chlorogensäure und 80,66% der Ausgangskonzentration an Quercetin in das Permeat. Bei dem in Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v) aufgegebenen Extrakt fallen mit 86,26% Chlorogensäure und 75,08% Quercetin diese Werte etwas geringer aus. In beiden Fällen konnten die retardierten Reste an Copigmenten durch den Spülschritt so weit entfernt werden, dass keine Copigmente mehr in der Eluatfraktion nachzuweisen waren. Die Eluate enthalten 99,74% (MeOH) bzw. 95,76% (EtOH) der Anthocyan-Ausgangskonzentration.

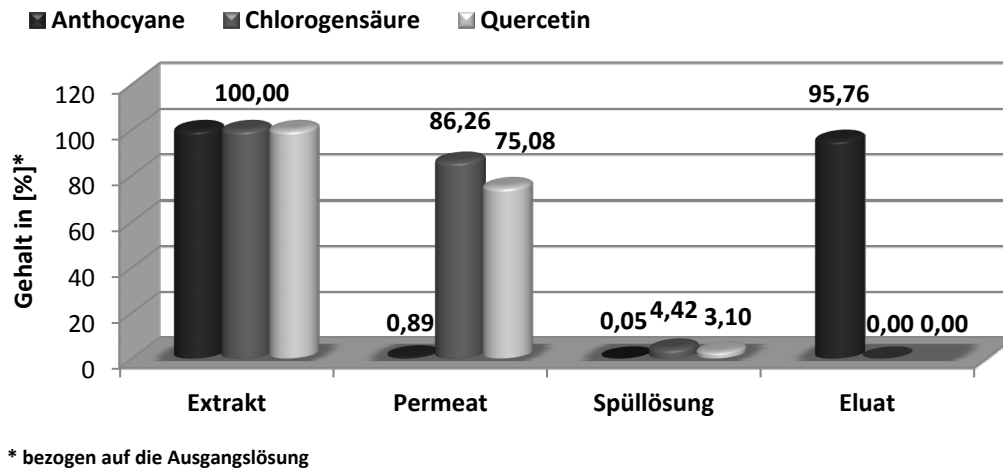


Abb. 3.62: Vergleich der Polyphenolgehalte der Fraktionen des in Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v) mit der Konzentration 1 mg/mL gelösten und mittels Membranchromatographie fraktionierten Heidelbeereextraktes.

Einen Vergleich der HPLC-DAD-Chromatogramme des Heidelbeereextraktes, der Permeat- (Copigmente) und der Eluatfraktion (Anthocyane) zeigt Abb. 3.63.

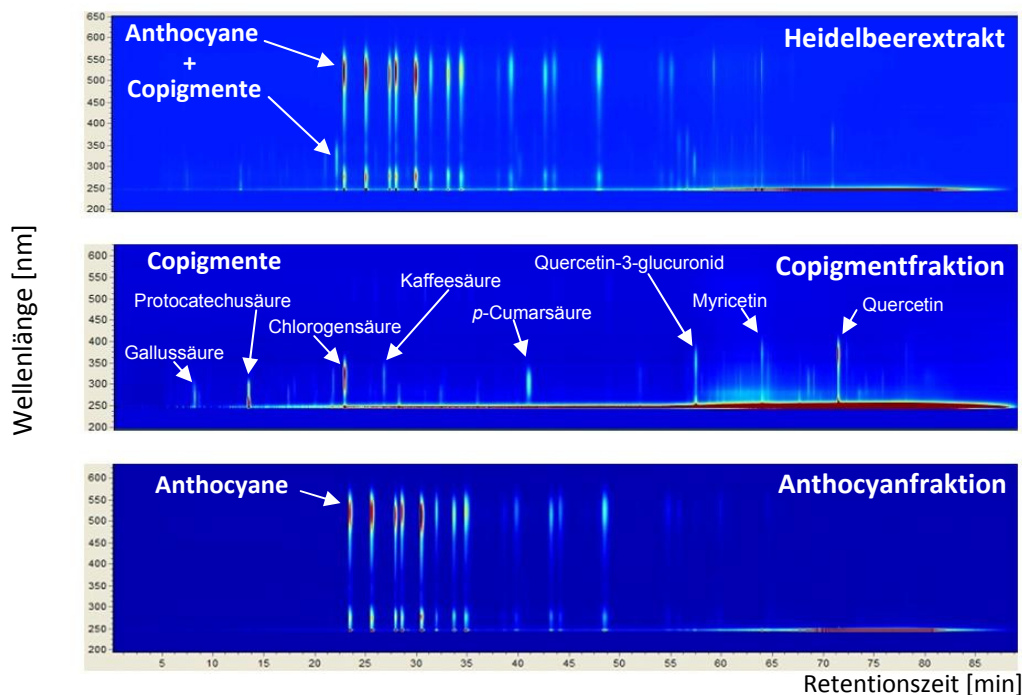


Abb. 3.63: Vergleich der HPLC-DAD-Chromatogramme des Extraktes und der nach Membranchromatographie mit Sartobind S75 erhaltenen Fraktionen.

Es wird deutlich, dass die im Extrakt vorhandenen Copigmente (Absorptionsmaxima zwischen 400 und 250 nm) vollständig von den Anthocyanen (Absorptionsmaxima bei 520 nm und 280 nm) abgetrennt werden können. Die Entfernung des Natriumchlorids aus den gefriergetrockneten Anthocyanfraktionen erfolgte durch Säulenchromatographie an XAD-7 Material (siehe Kapitel 5.4.6). Die Ausbeuten und Anthocyangehalte dieser Fraktionen zeigt die Tab. 3.13. Die mittels HPLC als Cyanidin-3-glucosid-Äquivalente quantifizierten Anthocyangehalte der Fraktionen lagen zwischen 75 und 80%. Hier sollten allerdings zwei Tatsachen berücksichtigt werden. Erstens liegen die Anthocyane in den gefriergetrockneten Fraktionen immer als Salze mit einem negativen Gegen-Ion vor (hier Acetate, weil die Ansäuerung zur Stabilisierung der Anthocyanfraktion mit Essigsäure erfolgte). Zweitens variieren die Adsorptionsmaxima der einzelnen in der Heidelbeere enthaltenen Anthocyane leicht. Die Quantifizierung als Cyanidin-3-glucosid-Äquivalente ist zwar die in der Literatur am häufigsten angetroffene Methode, ergibt aber aufgrund der Variationen der Absorptionsmaxima der Heidelbeeranthocyane etwas zu niedrige Gehalte (Kraus, 2007). Aus diesen Gründen ist von einer sehr hohen Reinheit > 90% der Anthocyanfraktionen auszugehen.

Tab. 3.13: Ausbeuten und Reinheiten der nach Membranchromatographie an Sartobind S75 aus 80 mg aufgegebenem Heidelbeerextrakt erhaltenen Anthocyanfraktionen.

Lösungsmittel	Methanol/Eisessig	Ethanol/Eisessig	HCl pH 2
Elutionsmittel	Methanol/NaCl-Lsg	Ethanol/NaCl-Lsg	Methanol/NaCl-Lsg
Ausbeute [mg]	25,5	24,7	26,5
Anthocyangehalt [%]*	80,10	78,34	75,97

*Gehalt ohne Berücksichtigung des Gegenions als Cyanidin-3-glc-Äquivalente.

Zusammenfassend zeigt sich anhand der bisherigen Ergebnisse, dass die Membranchromatographie hervorragend geeignet ist, um Anthocyane zu isolieren und von den Copigmenten zu trennen. Dabei sollten Extrakte am besten in Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) oder im Hinblick auf die Verwendung in Nahrungsergänzungsmitteln in Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v) gelöst werden. Auf diese Weise können auch die aus frischen Früchten gewonnenen Rohextrakte zunächst durch Adsorption an XAD-7 angereichert und die zur Elution der Anthocyane von der XAD-7 Säule verwendeten methanolischen bzw. ethanolischen Lösungen direkt zur Membranchromatographie eingesetzt werden (siehe Kapitel 5.4.5). Dadurch ist eine direkte Kombination der beiden Schritte, Anreicherung und Isolierung, realisierbar. Anthocyane aus wässrigen Lösungen können nach Ansäuern mit HCl auf pH 2 ebenfalls per Membranchromatographie getrennt werden. So können z. B. auch Säfte nach den obligatorischen Vorfiltrationsschritten direkt zur Membranchromatographie eingesetzt werden.

Als Beispiel dient hier die Membranchromatographie eines Cranberrysaftes, der aufgrund seines höheren Quercetin- und Copigment-Gehaltes gegenüber der Heidelbeere gewählt wurde, um die Eignung der entwickelten Methode auch im Hinblick auf andere anthocyanhaltige Proben zu bestätigen. Abb. 3.64 zeigt die HPLC-DAD Chromatogramme der aus der Membranchromatographie erhaltenen Fraktionen eines mit HCl auf einen pH-Wert von 2 gebrachten Cranberrysaftes. Die hydrophileren Verbindungen unter den Copigmenten gelangen direkt in das Permeat, während die lipophileren Quercetinderivate zunächst mit den Anthocyanen vom Membranadsorber retardiert werden. Diese können allerdings durch den Spülschritt mit 60 mL Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) soweit

eliminiert werden, dass sie nicht mehr im Retentat bzw. Eluat nachgewiesen werden können. Es wird eine reine Anthocyanfraktion aus Cranberry mit einem Anthocyangehalt > 90% erhalten.

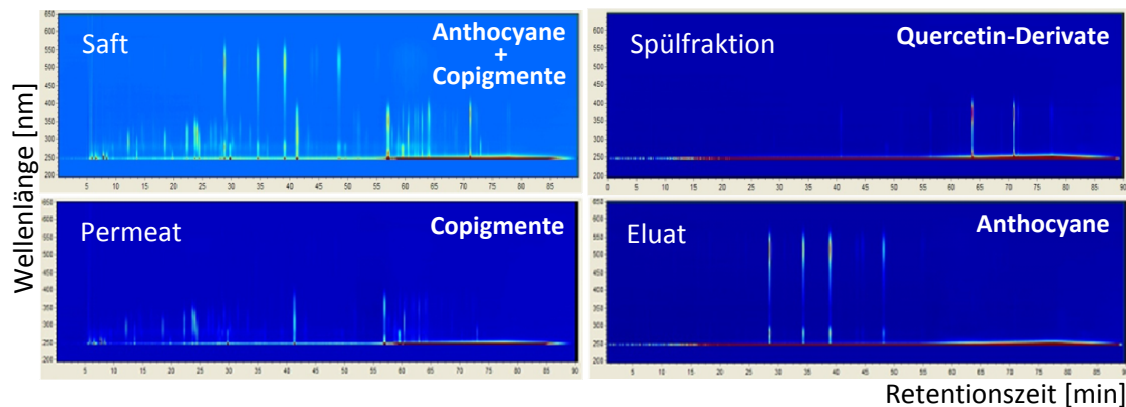


Abb. 3.64: HPLC-DAD-Chromatogramme der erhaltenen Fraktionen nach Membranchromatographie eines Cranberrysaftes.

Damit konnte gezeigt werden, dass sich die Methode ebenfalls eignet, um Anthocyane direkt aus Säften und wässrigen Lösungen, ohne vorherige Aufkonzentrierung, zu isolieren. Hierbei sei aber darauf hingewiesen, dass die Membranchromatographie wässriger Proben wie Säfte, aufgrund der darin gelösten Partikel, Zellbestandteile und Schleimstoffe, ohne eine gründliche Vorfiltration zum sofortigen Druckanstieg und Verstopfen des Adsorbers führt (vergl. Kapitel. 3.5.4.2). Im Falle des Cranberrysaftes war es sogar notwendig, die störenden Bestandteile durch Zentrifugation und zusätzliche Filtration zu entfernen. Danach war die Membranchromatographie auch mit dem Saft problemlos möglich. Somit konnte durch die Entwicklung der membranchromatographischen Methode erstmals eine Möglichkeit zur Isolierung von hochreinen Anthocyanfraktionen aus Heidelbeerextrakten und anthocyanhaltigen Säften gefunden werden. Ein Scale-Up zur Isolierung größerer Mengen an Anthocyanen im präparativen Maßstab wird im nächsten Kapitel gezeigt.

3.5.2 Scale-up der entwickelten membranchromatographischen Methode

Für das Scale-up der Membranchromatographie wurde ein Membranadsorber des Typs Sartobind S IEX 150 ml verwendet. Abb. 3.65 zeigt diesen Membranadsorber sowie einen Querschnitt zur Veranschaulichung des Strömungsprofils im Inneren der Adsorbereinheit. Der Zulaufstrom erfolgt vom äußeren Kanal durch die Membran nach innen. Durch die zylindrische Anordnung der Membran wird trotz der relativ geringen Betthöhe von 8 mm eine Membranoberfläche von 0,55 m² erreicht (weitere Daten zum Adsorber unter Kapitel 5.3.9.2). Rein rechnerisch sollte, aus den für die Anthocyane ermittelten dynamischen Bindungskapazitäten von 30,4 – 55,0 mg der S75-Membranadsorbereinheiten, durch das Scale-up mit dem Faktor 73,5 an Membranoberfläche, eine Isolation von 2,2 – 4,0 g Anthocyanen je nach Extraktlösungsmittel möglich sein.

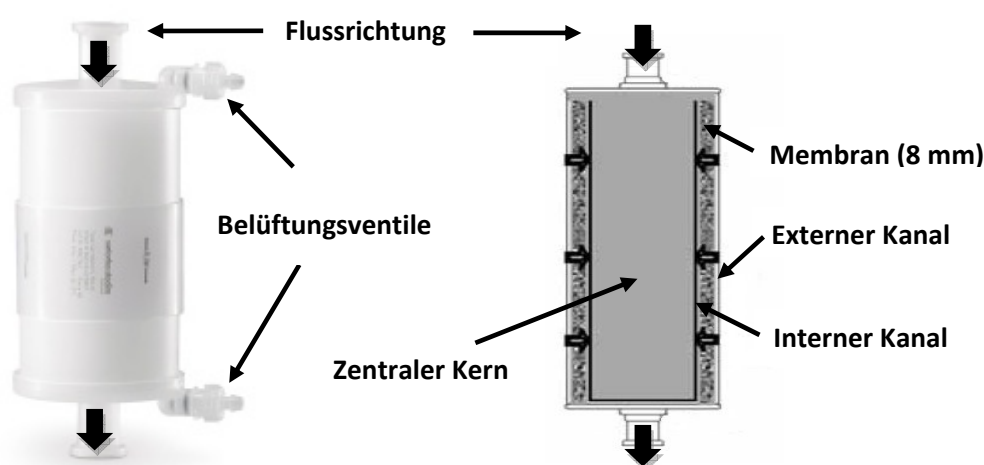


Abb. 3.65: Für das Scale-up verwendete Membranadsorbereinheit Sartobind S IEX 150 ml sowie ein Querschnitt zur Veranschaulichung des Strömungsprofils (Bildquelle: Sartorius, Göttingen, Deutschland).

Für die Durchführung des Scale-up wurde das in Abb. 3.66 gezeigte Fließschema genutzt, welches anhand der Erfahrungen mit dem Sartobind S75 Membranadsorber errechnet und anhand der im Folgenden gezeigten Ergebnisse entwickelt wurde. Zunächst wird der Extrakt in wässriger HCl oder in Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) bzw. Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v) gelöst, bevor durch einen Faltenfilter unlösliche Extraktbestandteile entfernt werden. Für einen zusätzlichen Schutz der Adsorber-Einheit sorgt eine Sartopore 2 300 Filtercapsule (0,45 + 0,2 µm), welche in sämtlichen Schritten dem Membranadsorber vorgeschaltet wird. Vor der Aufgabe des Extraktes wird der Membranadsorber mit jeweils 2,5 L 1M NaOH sowie mit 2,5 L 0,01 M HCl gespült. Anschließend erfolgt eine Equilibrierung mit 1 L des Extraktlösungsmittels, bevor der Adsorber beladen wird. Nach Aufgabe der Extraktlösung erfolgt ein Spülschritt mit 1 L Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) bzw. Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v), um Reste von Copigmenten und andere ungeladene Verbindungen vor der Elution der Anthocyane zu entfernen. Zur Elution der Anthocyane wird 1 L einer Mischung aus 1M wässriger NaCl-Lösung und Methanol bzw. Ethanol im Verhältnis 1:1 (v/v) verwendet. Genaue Informationen zur Durchführung der Membranchromatographie im präparativen Maßstab finden sich im Material- und Methodenteil im Kapitel 5.4.3.2.

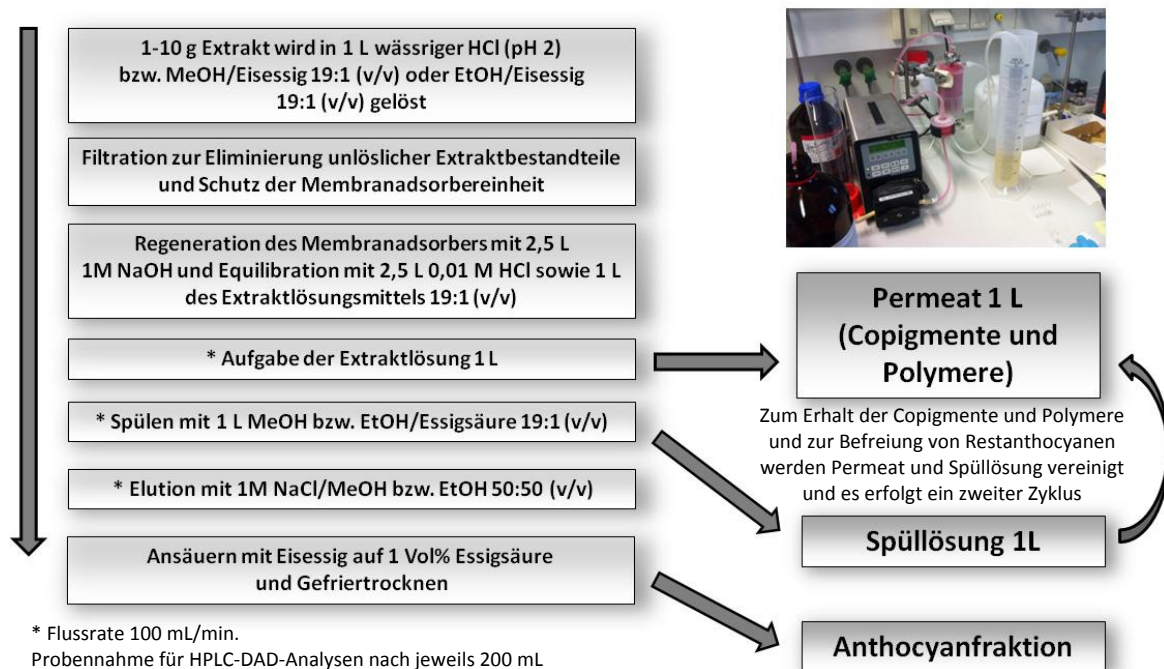


Abb. 3.66: Fließschema für das Scale-up der Membranchromatographie zur Isolierung von Anthocyanen im präparativen Maßstab.

Abb. 3.67 zeigt den Versuchsaufbau für die Durchführung der Membranchromatographie. Im linken Bild ist die Aufgabe der Extraktlösung auf den Membranadsorber zu sehen. Der aufgrund des hohen Anthocyangehaltes stark violett eingefärbte Extrakt **(A)** wird aus der braunen Flasche mittels der Pumpe **(B)** durch die Vorfiltereinheit **(C)** zum Membranadsorber **(D)** befördert. Dort werden die Anthocyane retardiert, das stark entfärbte Permeat **(E)** tritt aus dem Membranadsorber aus und wird in einem Messzylinder aufgefangen. Alle 200 mL werden HPLC-Proben genommen, um die Konzentrationen der Anthocyane und Copigmente im Eluat zu bestimmen. Im Bild rechts ist der Elutionsmodus der auf dem Membranadsorber retardierten Anthocyane zu sehen. Diese werden mit der NaCl-haltigen Elutionslösung **(F)** im Austausch gegen Na^+ -Ionen vom Membranadsorber eluiert und somit die Retentat- bzw. Anthocyanfraktion **(G)** erhalten.

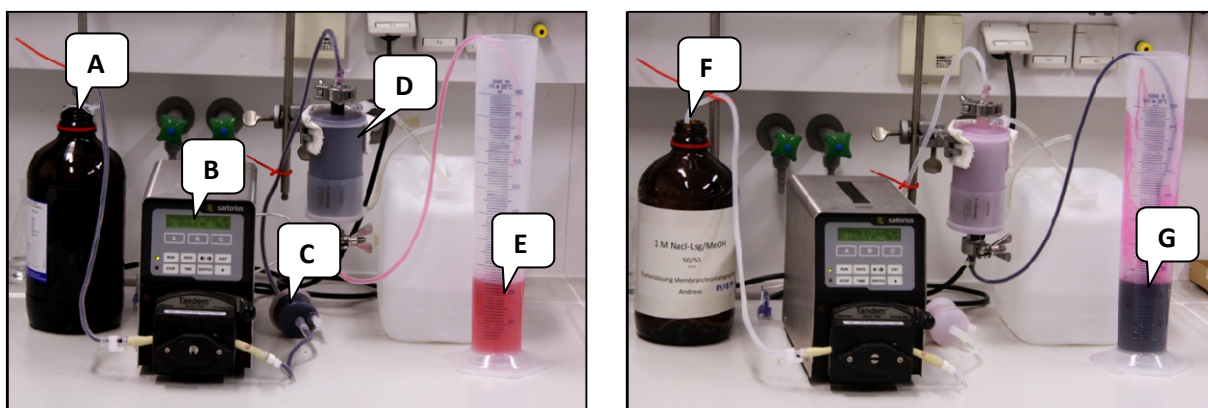


Abb. 3.67: Versuchsaufbau für die Durchführung der Membranchromatographie zur Isolierung von Anthocyanen.

Zunächst wurden, wie im semipräparativen Maßstab, einige Retentionsstudien durchgeführt. Um die ideale Extraktkonzentration in Bezug auf die Anthocyanretention zu ermitteln, wurden Extraktlösungen verschiedener Konzentration auf den Membranadsorber aufgegeben. Dabei zeigte sich, dass die Konzentration der Extraktlösung, bei ansonsten gleichen Bedingungen (gleiches Extraktlösungsmittel; Fluss 100 mL/min), einen Einfluss auf die dynamische Bindungskapazität des Adsorbers hat. Abb. 3.68 zeigt einen solchen Vergleich für die Extraktkonzentrationen 2 g/L und 10 g/L gelöst in Methanol/Eisessig 19:1 (v/v). Bezogen auf die aufgegebenen Extraktmenge wird bei der höheren Konzentration eine bessere Anthocyanretention und somit eine höhere dynamische Bindungskapazität erreicht. Während bei der geringer konzentrierten Extraktlösung bereits nach umgerechnet 8 g aufgegebenen Extraktmenge die dynamische Bindungskapazität der Adsorbereinheit überschritten und ein Anthocyangehalt > 10% der Ausgangskonzentration im Permeat erreicht wird, ist dies bei der höher konzentrierten Extraktlösung erst nach einer Beladungsmenge von umgerechnet etwa 10,5 g Extrakt der Fall. Bei einem Anthocyangehalt von 27,6% des verwendeten Heidelbeerextraktes entspricht dies in etwa einer dynamischen Bindungskapazität von ca. 2,9 g Anthocyanen auf der Adsorbereinheit, während die dynamische Bindungskapazität bei der geringer konzentrierten Extraktlösung mit ca. 2,2 g auch deutlich geringer ausfällt.

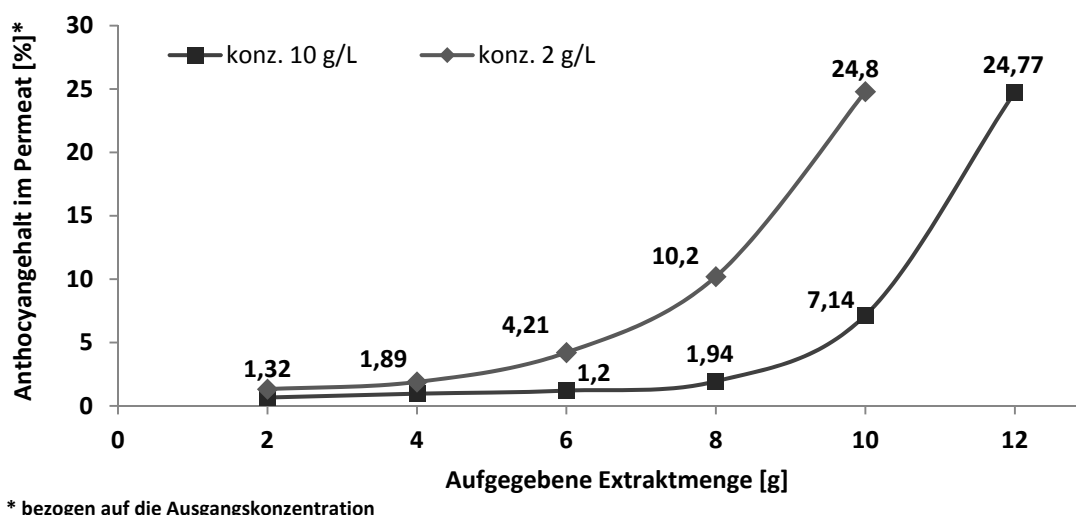
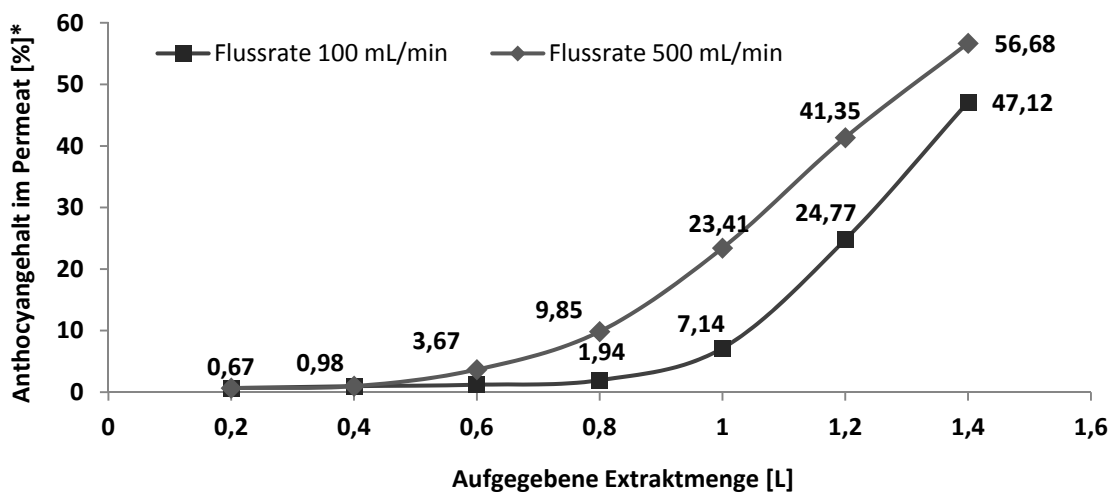


Abb. 3.68: Vergleich der Anthocyanretention des Membranadsorbers bei unterschiedlichen Extraktkonzentrationen von 2 g/L und 10 g/L, gelöst in MeOH/Eisessig 19:1 (v/v), bezogen auf die aufgegebenen Extraktmenge.

Es zeigte sich, dass das Arbeiten mit möglichst konzentrierten Extraktlösungen nicht nur aufgrund der Ersparnis von Lösungsmittel, von Arbeitszeit und der zur Aufkonzentrierung und Gefriertrocknung erforderlichen Energie, sondern auch aufgrund der höheren dynamischen Bindungskapazität bevorzugt werden sollte. Nicht zuletzt deshalb empfiehlt sich vor der Membranchromatographie eine Anreicherung der phenolischen Inhaltsstoffe mittels Amberlite® XAD-7. So können nicht nur höhere Konzentrationen an Anthocyanen und damit höhere Bindungskapazitäten gewährleistet, sondern auch störende Kationen vor der Membranchromatographie aus den Rohextrakten entfernt werden (vergl. Kapitel 3.5.4.1).

Um die für die Membranchromatographie optimale Flussrate zu ermitteln, wurden Extraktlösungen gleicher Konzentration (10 g/L) unter Variation der Flussrate auf den Adsorber aufgegeben. Dabei zeigte sich eine optimale dynamische Bindungskapazität für Anthocyane bei einer Flussrate von 100

mL/min. Abb. 3.69 zeigt einen Vergleich des in Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) gelösten Extraktes der Konzentration 10 g/L bei unterschiedlichen Beladungsgeschwindigkeiten von 100 und 500 mL/min. Es wird deutlich, dass bei der höheren Flussrate von 500 mL/min der 10%-Wert bereits nach einem Aufgabevolumen von ca. 0,8 L erreicht wird und somit die dynamische Bindungskapazität geringer ausfällt als bei einer Flussrate von 100 mL/min, bei welcher die dynamische Bindungskapazität erst bei einem Aufgabevolumen von > 1 L überschritten wird. Geringere Flussraten zeigten dagegen keinen nennenswerten Einfluss im Hinblick auf die Optimierung der dynamischen Bindungskapazität. Aufgrund des geringen Druckes (0,1 -0,4 bar; 500 mL/min) ist es durchaus möglich, höhere Flussraten zu fahren, wenn durch die Zeitersparnis auf bessere dynamische Bindungskapazitäten verzichtet werden kann. Ist dies nicht der Fall, so sollte die etwas bessere dynamische Bindungskapazität durch die optimale Flussrate von 100 mL/min ausgenutzt werden. In diesem Fall wird eine dynamische Bindungskapazität von ca. 2,9 g Anthocyanen auf der Adsorbereinheit erreicht.



* bezogen auf die Ausgangskonzentration

Abb. 3.69: Retentionsstudie zum Vergleich der dynamischen Bindungskapazitäten für Anthocyane bei variablen Flussraten. Heidelbeerextrakt gelöst in MeOH/Eisessig 19:1 (v/v), Konz. 10 g/L.

Weiterhin wurden die dynamischen Bindungskapazitäten des Adsorbers in den unterschiedlichen Extraktlösungsmitteln untersucht. Aufgrund der Ergebnisse der Methodenentwicklung im semipräparativen Maßstab zeigte auch die größere Membranadsorbereinheit erwartungsgemäß eine etwas geringere dynamische Bindungskapazität, wenn der Extrakt mit der Konzentration 10 g/L in Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v), statt in Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) gelöst wurde. So wurde der 10%-Wert bei dem in Ethanol/Eisessig gelösten Extrakt etwas früher, entsprechend einer Extraktmenge < 10 g Extrakt erreicht, während er bei dem in Methanol/Eisessig gelösten Extrakt erst nach einem Aufgabevolumen > 1L, entsprechend einer Extraktmenge > 10 g (> 2,7 g Anthocyane) erreicht wurde (siehe Abb. 3.70). Durch diesen nur sehr geringen Unterschied in den Bindungskapazitäten sind Methanol und Ethanol bei der Membranchromatographie praktisch austauschbar. Methanol kann immer dann durch Ethanol ersetzt werden, wenn die durch Membranchromatographie gewonnenen Fraktionen für *in vitro*-, *in vivo*- oder Humanstudien, oder z. B. nach einem weiteren Scale-up zur Produktion in industriellem Maßstab für den Einsatz in Lebens- oder Nahrungsergänzungsmitteln vorgesehen sind. Auch bei wässrigen Extraktlösungen (pH 2, HCl) zeigte der Adsorber in etwa gleiche dynamische Bindungskapazitäten von > 10 g Extrakt, entsprechend einer Menge > 2,7 g an Anthocyanen. Allerdings ist dieses Ergebnis nicht direkt vergleichbar, da hier aufgrund der Löslichkeit des Extraktes nur Extraktkonzentrationen von 2 g/L realisiert werden konnten.

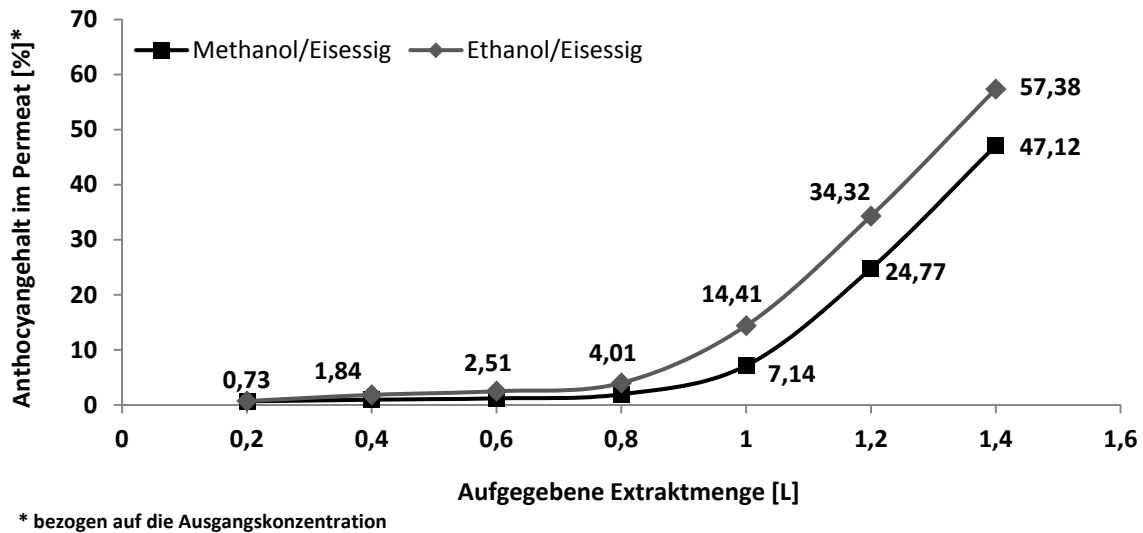


Abb. 3.70: Vergleich der dynamischen Bindungskapazitäten für Anthocyane bei Variation von Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) bzw. Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v) als Extraktlösungsmittel mit der Extraktkonzentration 10 g/L.

Aufgrund der bisher gezeigten Ergebnisse wurden die höchsten dynamischen Bindungskapazitäten für Anthocyane im Extraktlösungsmittel Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) bei einer Extraktkonzentration von 10 g/L und einer Flussrate von 100 mL/min erzielt. Daraus ergab sich eine dynamische Bindungskapazität der Adsorbereinheit von ca. 2,9 g Anthocyanen (entsprechend ca. 10,5 g Extrakt; Anthocyangehalt 27,6%). Bei einer Membranoberfläche von 5500 cm² entspricht das einer dynamischen Bindungskapazität für Anthocyane von > 0,5 mg/cm². Bis zum Erreichen der dynamischen Bindungskapazität gelangten weniger als 10% der aufgegebenen Anthocyane in die Permeatfraktion. Zur Trennung des Extraktes in eine Anthocyan- und eine Copigmentfraktion wird an diesem Punkt die Chromatographie unterbrochen, restliche retardierte Copigmente werden durch den Spülschritt entfernt und anschließend die Anthocyane vom Adsorber eluiert. Das copigmenthaltige Permeat kann anschließend mit der Spülfraction vereinigt und zur Eliminierung restlicher Anthocyane einer weiteren membranchromatographischen Trennung unterzogen werden (Abb. 3.71).

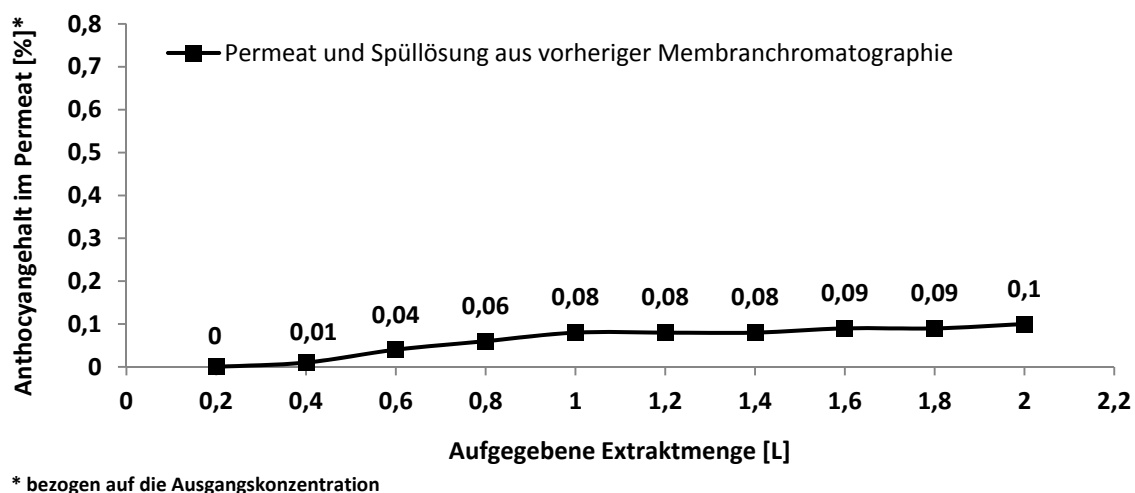


Abb. 3.71: Anthocyanretention während einer zweiten membranchromatographischen Trennung zur Befreiung der Permeat- und Spülfraction von Restanthocyanen.

Wurde auf diese Weise vorgegangen und nach Regeneration und Equilibrierung des Adsorbers das Permeat und die Spüllösung erneut auf den Adsorber aufgegeben, so konnte der Anthocyangehalt in der austretenden Lösung auf unter 0,1% des Ausgangsgehaltes der ursprünglichen Extraktlösung gesenkt und somit eine nahezu anthocyanfreie Fraktion erhalten werden. Gegebenenfalls lassen sich zu diesem Zweck auch zwei Membranadsorber in Reihe schalten. Ist jedoch die Copigmentfraktion nicht von Interesse und es sollen nur die Anthocyane in reiner Form isoliert werden, so kann theoretisch auch die maximale bzw. statische Bindungskapazität des Membranadsorbers genutzt werden. Zu diesem Zweck wird der Membranadsorber so lange mit der Extraktlösung beladen, bis der 100%-Wert erreicht ist. An diesem Punkt entspricht die Konzentration an Anthocyanen in der austretenden Permeat-Lösung der ursprünglichen Konzentration der aufgegebenen Extraktlösung, da ab diesem Zeitpunkt keine weiteren Anthocyane mehr retardiert werden und der Adsorber seine maximale Kapazität erreicht hat. Wurde der Extrakt mit der Konzentration 10 g/L in Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) gelöst und auf den Adsorber aufgegeben, wurde die maximale Bindungskapazität nach ca. 2,6 L erreicht (siehe Abb. 3.72). Zu diesem Zeitpunkt wurden ca. 26 g Extrakt bzw. ca. 7,2 g Anthocyane auf die Adsorbereinheit aufgegeben.

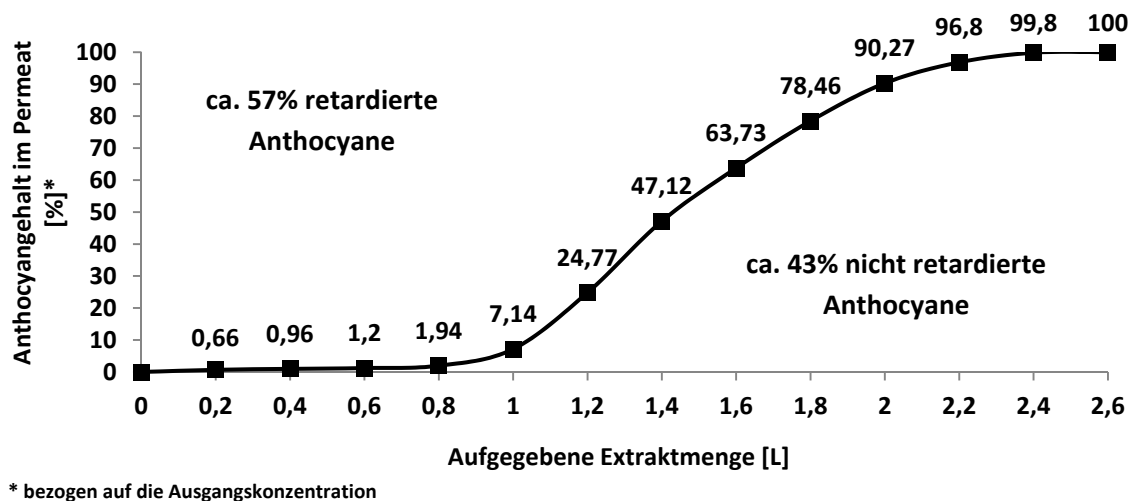


Abb. 3.72: Anthocyanretention des Adsorbers bis zum Erreichen der max. Bindungskapazität

Wird anschließend gespült, die Anthocyane eluiert und die Fraktion nach Entsalzen gefriergetrocknet, so werden 4,1 g der Anthocyanfraktion erhalten. Das heißt, in sehr guter Übereinstimmung mit den Flächen über und unter dem Graphen in Abb. 3.72, dass bis zum Erreichen der maximalen Bindungskapazität 57% der aufgegebenen Anthocyane vom Adsorber retardiert werden, während 43% den Membranadsorber passieren. Damit liegt die maximale Bindungskapazität des Adsorbers, bei den gefundenen optimalen Bedingungen mit 4,1 g Anthocyanen, um 41% höher als die dynamische Bindungskapazität. Allerdings werden bis zum Erreichen der maximalen Bindungskapazität auch ca. 43% der aufgegebenen Anthocyane nicht erfasst. Vom Erreichen der dynamischen (10%-Wert) bis zur maximalen Bindungskapazität (100%-Wert) müssen außerdem ca. 1,6 L Lösungsmittel zusätzlich aufgegeben werden. Je nach Zielsetzung ist deshalb vorher abzuwägen, ob es überhaupt sinnvoll ist, die maximale Bindungskapazität des Adsorbers auszunutzen.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, die Membranoberfläche durch Reihenschaltung mehrerer Adsorbereinheiten mit abnehmender Kapazität zu erhöhen. Dadurch werden steilere Durchbruchkurven und geringere Unterschiede zwischen der dynamischen und der maximalen Bindungskapazität erreicht, denn der Gesamtdurchbruch erfolgt erst beim Erreichen der

dynamischen Bindungskapazität des letzten Adsorbers in der Reihe. Da der letzte Adsorber allerdings die kleinste Oberfläche besitzt, ist der Unterschied zwischen dynamischer und maximaler Bindungskapazität im Vergleich sehr gering, wodurch der Gesamtdurchbruch des Systems nun viel steiler verläuft (Demmer und Nussbaumer, 1999).

Ein weiterer wichtiger Punkt für die Fraktionierung der Extraktbestandteile ist die Betrachtung der Retention der Copigmente während der Probenbeladung. Wie auch im semipräparativen Maßstab werden in wässrigen Extraktlösungen oder Säften die hydrophileren Copigmente kaum, die lipophileren Copigmente, wie das Quercetin, zu 100% vom Membranadsorber retardiert (vergl. Abb. 3.53). Bei den in Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) bzw. Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v) gelösten Extrakten verhält es sich ebenfalls analog zur membran chromatographischen Trennung im semipräparativen Maßstab. Jetzt werden auch die lipophileren Copigmente, wie das Quercetin, nicht mehr so stark von der Membranadsorbereinheit zurückgehalten. Abb. 3.73 zeigt die Chlorogensäure- und Quercetingealte im Permeat während der Membranchromatographie eines in Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) gelösten Extraktes der Konzentration 2 g/L. Durch die gewählte Konzentration und das Aufgabevolumen von 3 L (entsprechend 6 g Extrakt) befinden wir uns noch in einem Bereich, in dem die dynamische Bindungskapazität des Adsorbers nicht ausgeschöpft wird. Während die Anthocyane zu mehr als 90% retardiert und weniger als 10% in das Permeat gelangen, wird die Chlorogensäure kaum retardiert und ist zu 90-95% im Permeat nachzuweisen. Die lipophileren Copigmente, hier stellvertretend das Quercetin, gelangen über den Verlauf der Chromatographie zwischen 46 und 65% in das Permeat. Gleiches gilt für die in Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v) gelösten Extrakte.

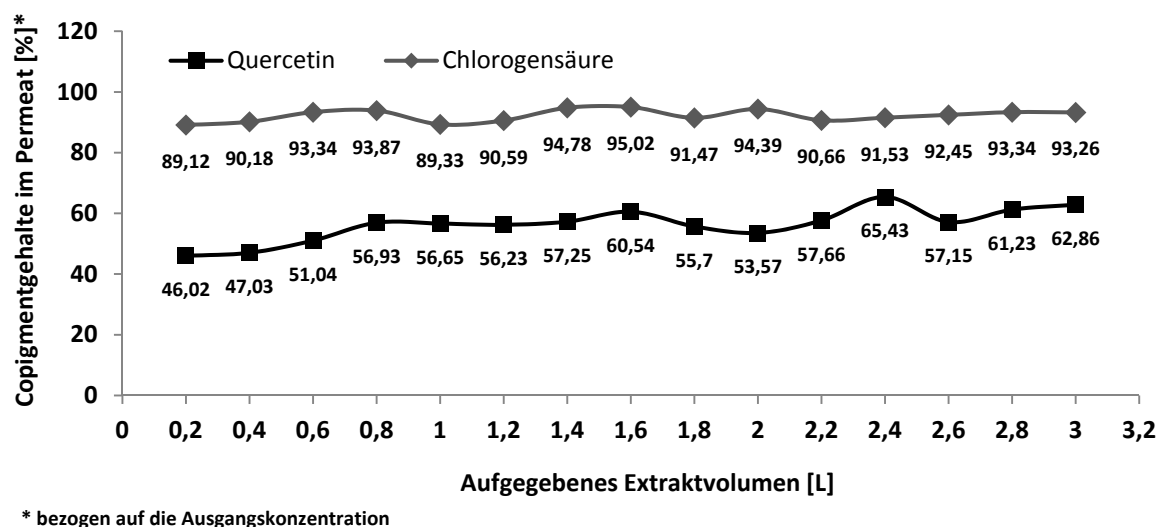


Abb. 3.73: Retention der Copigmente während der Probenbeladung des in MeOH/Eisessig 19:1 (v/v) gelösten Extraktes mit der Konzentration 2 g/L.

Somit ist eine sehr gute Trennung von Anthocyanen und Copigmenten während der Membranchromatographie vor Erreichen der dynamischen Bindungskapazität des Adsorbers gewährleistet, vorausgesetzt, restliche retardierte Copigmente lassen sich vor Elution der Anthocyane analog dem semipräparativen Maßstab durch einen Spülschritt entfernen. Erwartungsgemäß ist dies auch der Fall. Bereits nach einem Spülvolumen von 600 mL waren keine Copigmente mehr in der Spüllösung nachweisbar, wie aus Abb. 3.74 deutlich hervorgeht. Durch ein Spülvolumen von 1 L wird somit sichergestellt, dass sämtliche eluierbaren Copigmente vor der Elution der Anthocyane eliminiert werden.

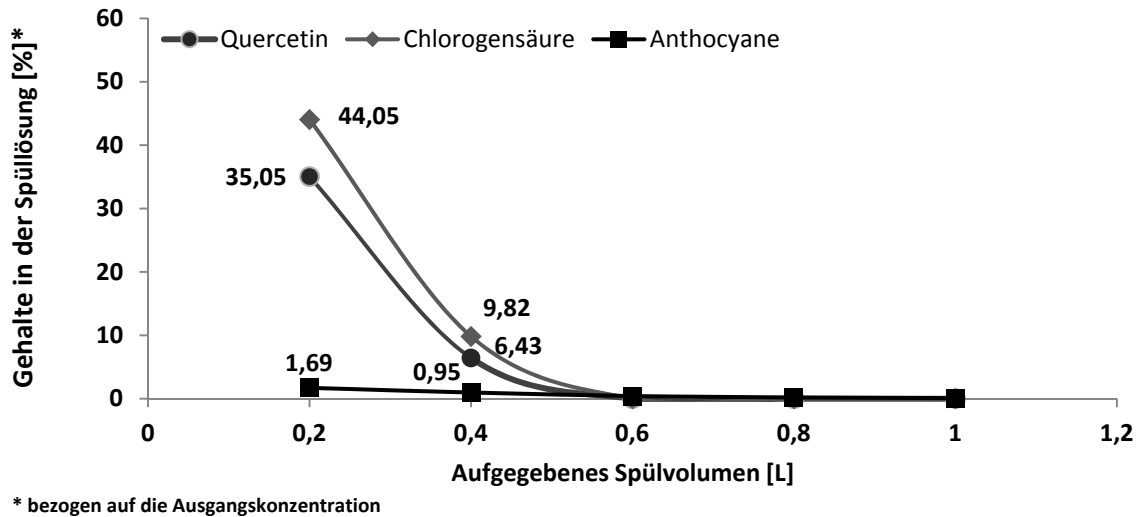


Abb. 3.74: Gehalte an Copigmenten und Anthocyanen in der Spüllösung während des Spülschrittes mit Methanol/Eisessig 19:1 (v/v).

Weiterhin wird deutlich, dass durch den Spülschritt kein großer Verlust an retardierten Anthocyanen stattfindet, da die Konzentration der Anthocyane in der Spüllösung anfangs mit 1,69% sehr gering ist und während des Spülens kontinuierlich abnimmt. Somit ist auch bei einem größeren Spülvolumen kein weiterer Verlust retardierter Anthocyane vom Membranadsorber zu befürchten. Da sich in der Spüllösung anfangs jedoch noch ein größerer Anteil an Copigmenten befindet, sollte sie anschließend mit dem Permeat vereinigt werden, um größere Verluste an Copigmenten zu vermeiden.

Wie bereits zuvor gezeigt, lassen sich die Restanthocyane aus Permeat und Spülfraction sehr gut durch eine zweite membran chromatographische Trennung entfernen (siehe Abb. 3.71). Nach dem Spülen erfolgt die Elution der retardierten Anthocyane mit der 1 M NaCl-Lösung gemischt mit Methanol bzw. Ethanol im Verhältnis 1:1 (v/v). Die Elutionskurve in Abb. 3.75 zeigt, dass bereits nach dem 3- bis 4-fachen Bettvolumen des Adsorbers (3-4 x 150 mL) der Großteil der Anthocyane eluiert wird.

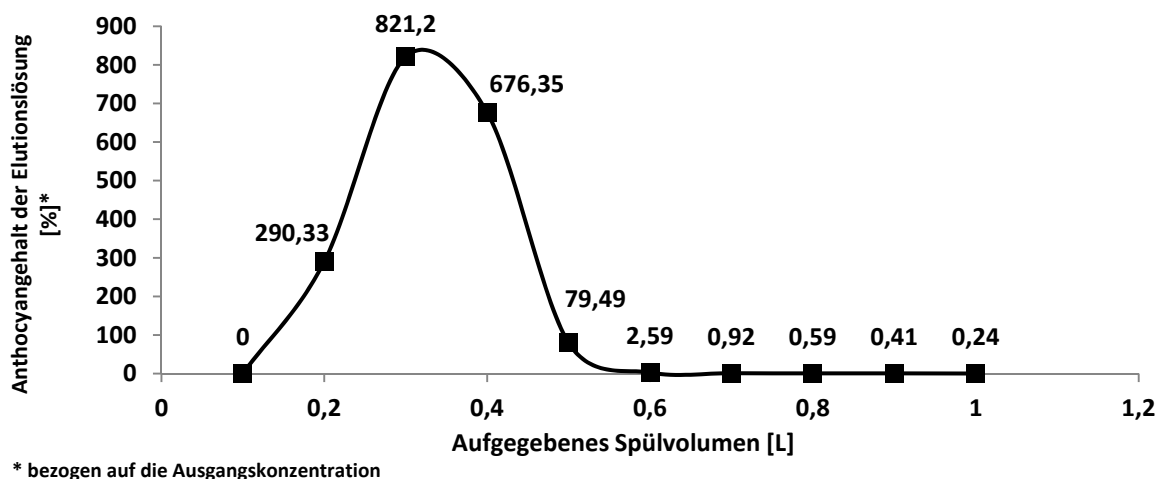


Abb. 3.75: Elutionskurve der retardierten Anthocyane mit 1M methanolischer NaCl-Lsg. 50:50 (v/v).

So entspricht die Konzentration der Anthocyane in der Elutionslösung nach 300 mL 821,20% der ursprünglich aufgegebenen Extraktlösung, nach 600 mL allerdings nur noch 2,59%. Spätestens nach

einem Volumen von 1 L kann die Elution abgebrochen werden, da hier die Konzentration an Anthocyanen nur noch 0,24% der ursprünglich aufgegebenen Extraktlösung entspricht und keine nennenswerten Mengen an Anthocyanen mehr eluiert werden können.

Diese bisher gezeigten Ergebnisse dienen anschließend zur Erstellung des am Kapitelanfang dargestellten Fließschemas (siehe Abb. 3.66) und der im Material- und Methodenteil unter 5.4.3.2 beschriebenen Methode zur Isolierung von Anthocyanen. Im folgenden Kapitel wird gezeigt, wie diese Methode zur Fraktionierung eines Heidelbeerextraktes genutzt werden kann.

3.5.3 Anwendung der Membranchromatographie zur Fraktionierung eines Heidelbeerextraktes

Wie bereits beschrieben war der Grund zur Entwicklung der membranchromatographischen Methode die Möglichkeit, anthocyanhaltige Extrakte vollständig und ohne Rückstände von gesundheitsschädlichen Lösungsmitteln und Reagenzien fraktionieren zu können. Mittels der Ergebnisse des vorherigen Kapitels und der daraus entwickelten präparativen membranchromatographischen Methode (Kapitel 5.4.3.2) wird im Folgenden die Fraktionierung eines kommerziellen Heidelbeerextraktes gezeigt.

Zur Fraktionierung des kommerziellen Heidelbeerextraktes werden 10 g Heidelbeerextrakt in Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) oder Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v) gelöst und einer membranchromatographischen Trennung im präparativen Maßstab unterzogen. Durch die optimierten Bedingungen (Konzentration der Lösungen 10 g/L; Flussrate 100 mL/min) wird gewährleistet, dass maximal 10% der ursprünglich aufgegebenen Anthocyane in das Permeat (die Copigmentfraktion) gelangen. Denn wie im vorhergehenden Kapitel bereits gezeigt wurde, befinden wir uns nach Aufgabe von 1L der Extraktlösung (entsprechend 10 g Extrakt) noch im Bereich der dynamischen Bindungskapazität (10%-Wert) der Adsorbereinheit. Die Restmenge an Anthocyanen im Permeat (< 10%) sowie in der Spülfraction kann nach Vereinigung beider Fractionen durch einen zweiten membranchromatographischen Zyklus entfernt werden. Bei Vorhandensein eines zweiten Adsorbers kann durch Reihenschaltung beider Adsorbereinheiten die Adsorption und somit die Entfernung von über 99,8% der aufgegebenen Anthocyane aus dem Extrakt in einem Schritt erfolgen. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde nach abschließender Gefriertrocknung die nahezu anthocyanfreie Permeatfraction mit einer Auswaage von 5,0 g (50% der aufgegebenen Extraktmenge) erhalten.

Um die Anthocyanfraction zu erhalten, erfolgt die Elution der Anthocyane nach dem Spülschritt, gemäß der beschriebenen Methode (Kapitel mit 1L der NaCl-haltigen Elutionslösung. Aufgrund des neutralen pH-Wertes dieser Lösung kommt es dabei sehr schnell zu einem Anthocyanabbau. Deshalb wird das Eluat sofort mit Eisessig auf einen Gesamtessigsäuregehalt von 1 Vol-% angesäuert. Danach sind die Anthocyane stabil und es entsteht während der vollständigen Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer (max. 35°C) und der anschließenden Eliminierung des NaCl durch Adsorption an Amberlite® XAD-7 (siehe Kapitel 5.4.6) kein Anthocyanverlust. Nach dem Entsalzen werden jeweils 3,7 g der reinen Anthocyan-Fractionen aus 10 g des Heidelbeerextraktes erhalten (37% der ursprünglichen Extraktmenge).

Aus den Auswaagen der Anthocyanfraction (37%) und der Permeatfraction (50%) folgt ein Verlust von 13% der ursprünglich aufgegebenen Extraktmasse. Dabei handelt es sich einerseits um unlösliche Extraktbestandteile, die während der Vorfiltration eliminiert werden (3%), andererseits

um ca. 10% an unbekannten Verbindungen aus dem Extrakt, die vom Membranadsorber adsorbiert und nicht wieder eluiert werden konnten. Diese wurden erst während der Regeneration mit NaOH vollständig vom Membranadsorber gespült und dabei durch die stark basischen Bedingungen zerstört. Dadurch ist die vollständige Regeneration des Adsorbers gewährleistet, so dass bei einem erneuten Trennungszyklus die gefundene dynamische Bindungskapazität und auch die maximale Bindungskapazität des Adsorbers wieder erreicht werden. Die vollständige Regenerierbarkeit des Adsorbers bleibt selbst nach mehr als 50 Trennungen noch erhalten, d.h. es wurden die gleichen Bindungskapazitäten wie bei einem neuen Adsorber erreicht. Für die Fraktionierung von anthocyanhaltigen Extrakten war eine Überprüfung im Rahmen dieser Arbeit zwar nicht möglich, bei der Proteinaufreinigung können jedoch mehr als tausend Zyklen ohne Abnahme der Bindungskapazitäten der Adsorber gefahren werden (Fischer-Frühholz, 2004). Bei der Membranchromatographie entsteht, im Gegensatz zur CCC, bei der es keine adsorptiven Effekte gibt (vergl. Kapitel 2.3.3), ein Verlust von ca. 10% an unbekannten, wahrscheinlich polymeren Extraktbestandteilen durch adsorptive Effekte, die allerdings die Trennung nicht weiter stören. Der große Vorteil der Membranchromatographie ist, dass die zur Fraktionierung vorgesehenen und mittels HPLC-DAD detektierbaren phenolischen Verbindungen im Gegensatz zur CCC vollständig voneinander getrennt werden, ohne auf perfluorierte Reagenzien zurückgreifen zu müssen. So finden sich in der Permeat- bzw. Durchflussfraktion die Copigmente sowie die polymeren Verbindungen, während die isolierten Anthocyane mit der Retentat- bzw. Eluatfraktion gewonnen werden, wie anhand der durchgeführten HPLC-Analytik gezeigt werden kann. Abb. 3.76 zeigt die HPLC-Chromatogramme des Heidelbeerextraktes (1), der Anthocyan- (2) sowie der Permeatfraktion (3), auf der linken Seite jeweils bei einer Detektionswellenlänge von 280 nm (a), auf der rechten Seite bei 520 nm (b).

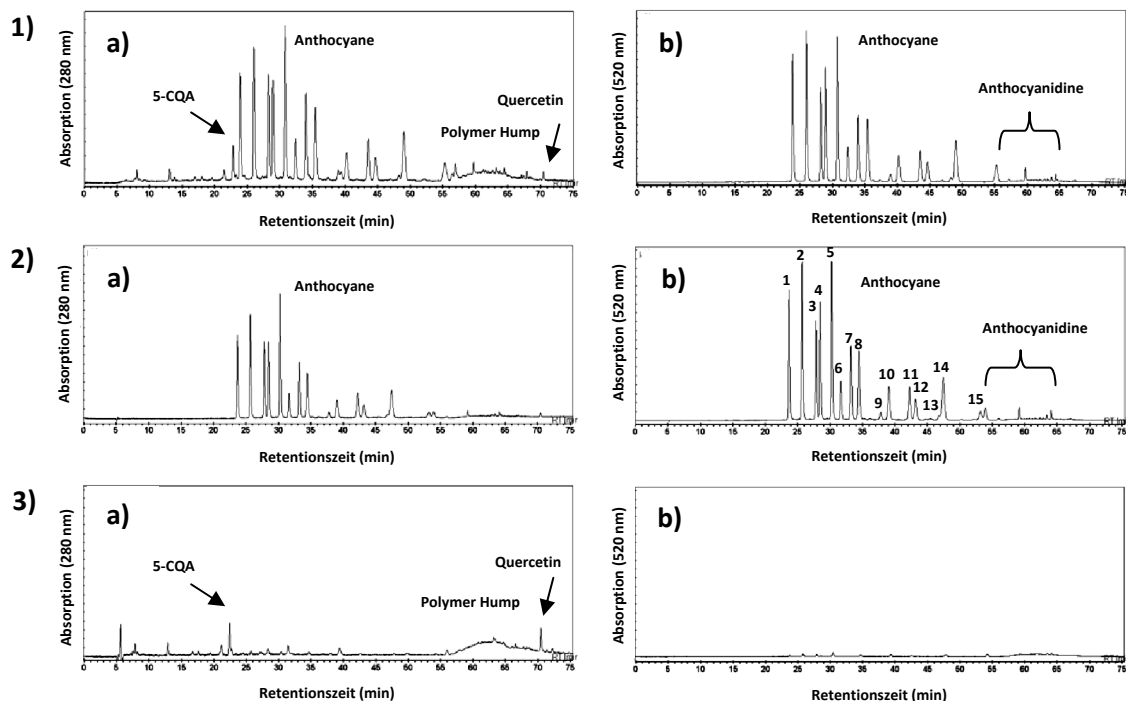


Abb. 3.76: HPLC-Chromatogramme des Extraktes (1) sowie der nach Membranchromatographie erhaltenen Anthocyan- (2) und Durchflussfraktion (3). Links (a) detektiert bei jeweils [280 nm] und rechts (b) bei jeweils [520 nm]. Peak-Nr. siehe Tab. 3.1.

Da die Anthocyane zwei Absorptionsmaxima bei 280 und 520 nm zeigen, können sie anhand dieses Vergleichs gut von den ausschließlich im Bereich um 280 nm absorbierenden Copigmenten unterschieden werden. Bei der Betrachtung des Chromatogrammes (1a, 280 nm) des Heidelbeerextraktes fällt auf, dass nicht nur Peaks der Anthocyane und Copigmente, sondern auch ein sogenannter "Polymer Hump" detektiert wird. Dieser erstreckt sich über die Retentionszeiten von 55 bis 70 min und wird durch die polymeren Verbindungen des Extraktes verursacht. Im Gegensatz dazu zeigt das Chromatogramm des Extraktes bei der Wellenlänge von 520 nm (1b) nur die durch die Absorption der Anthocyane hervorgerufenen Peaks. Die Chromatogramme 2a und 2b der Anthocyanfraktion sind dagegen nahezu identisch und zeigen nur die Peaks der Anthocyane. Dadurch wird deutlich, dass die im Extrakt enthaltenen Copigmente und polymeren Bestandteile vollständig abgetrennt wurden. Weiterhin ist offensichtlich, dass sich das Anthocyan-Profil dieser Fraktion im Vergleich zum Extrakt nicht verändert hat. Das heißt, alle der 15 in dem Extrakt vorhandenen Anthocyane werden während der Trennung gleichermaßen erfasst und können ohne Verluste komplett vom Adsorber eluiert werden. Das Chromatogramm der Permeatfraktion (3b) zeigt bei 520 nm hingegen keine Peaks. Somit handelt es sich um eine komplett anthocyanfreie Fraktion. In dieser Fraktion können nur die Copigmente und Polymere bei 280 nm (3a) detektiert werden. Die gezeigten Chromatogramme verdeutlichen somit die vollständige Trennung der Anthocyane und Copigmente aus dem Extrakt durch die Membranchromatographie.

3.5.3.1 Trennung von Copigmenten und polymeren Extraktbestandteilen

Nachdem die Anthocyane durch Membranchromatographie aus dem Extrakt entfernt wurden, konnten aus der resultierenden Permeatfraktion die Copigmente durch Lösungsmittlextraktion von den verbleibenden polymeren Extraktbestandteilen abgetrennt werden. Zu diesem Zweck wird die Permeatfraktion in Wasser/Methanol 4:1 (v/v) bzw. Wasser/Ethanol 4:1 (v/v) gelöst. Die Extraktion mit Ethylacetat ermöglicht anschließend die Trennung der weniger polaren Copigmente (Ethylacetatphase) von den polareren und polymeren Extraktbestandteilen (wässrige Phase), nach der im Material und Methodenteil beschriebenen Methode (siehe Kapitel 5.4.7). Das preiswertere, aber giftige Methanol eignet sich zur Gewinnung von Fraktionen für photometrische Testungen, z. B. Bestimmung der antioxidativen Aktivität, kann aber durch Ethanol ersetzt werden, falls Fraktionen z. B. zur Verwendung in Humanstudien gewonnen werden sollen. In beiden Fällen werden die Copigmente vollständig von den polareren polymeren Bestandteilen abgetrennt und quantitativ nahezu identische Fraktionsgrößen erhalten. Die Abb. 3.77 zeigt das Fraktionierungsschema der Permeatfraktion sowie einige zur Verdeutlichung der Trennung ausgewählte HPLC-DAD-Chromatogramme der Subfraktionen. Während die aus der Membranchromatographie erhaltene Permeatfraktion neben den Copigmenten noch den typischen „Polymerhump“ im Bereich von 55-70 min zeigt, verdeutlichen die folgenden Chromatogramme die vollständige Trennung von Copigmenten und Polymeren. Nach Gefriertrocknen können in der wässrigen Fraktion, die einen Masseanteil von 29,40% am Gesamtextrakt ausmacht, keine Copigmente mehr mittels HPLC detektiert werden. Bei einer Wellenlänge von 280 nm zeigte sich jedoch der typische Polymerhump im Bereich zwischen 60 und 75 min. Diese Polymerfraktion ist nicht komplett wasserlöslich. Durch Lösen in 10 mL Methanol und anschließendem Zutropfen von 250 mL H₂O unter Rühren, sowie Abfiltrieren des erhaltenen Präzipitats, kann sie in eine polare wasserlösliche (Filtrat 17,2% Anteil am Gesamtextrakt) sowie in eine unpolarere MeOH-lösliche (Präzipitat, 12,2% Anteil am Gesamtextrakt) Fraktion getrennt werden. Anteile der eher unpolareren polymeren Verbindungen koeluieren bei HSCCC Trennungen anthocyanhaltiger Extrakte mit den Anthocyanen. Sie sind zusammen mit den

polareren Copigmenten für die geringeren Reinheiten der Anthocyanfraktionen verantwortlich, die aus HSCCC-Trennungen von Extrakten, verglichen mit HSCCC-Trennungen der durch Membranchromatographie gewonnenen reinen Anthocyanfraktionen, erhalten werden. Der polare Anteil der Polymerfraktion eluiert dagegen bei den HSCCC-Trennungen mit dem Durchbruchspeak und fehlt weitestgehend bei HSCCC-Trennungen der durch Membranchromatographie aufgereinigten Anthocyane, wie im Kapitel 3.5.4.5 anhand der Isolierung von Anthocyan-Diglucosiden aus Granatapfel gezeigt werden kann. Im HPLC-DAD-Chromatogramm zeigen beide Polymerfraktionen den typischen „Polymerhump“.

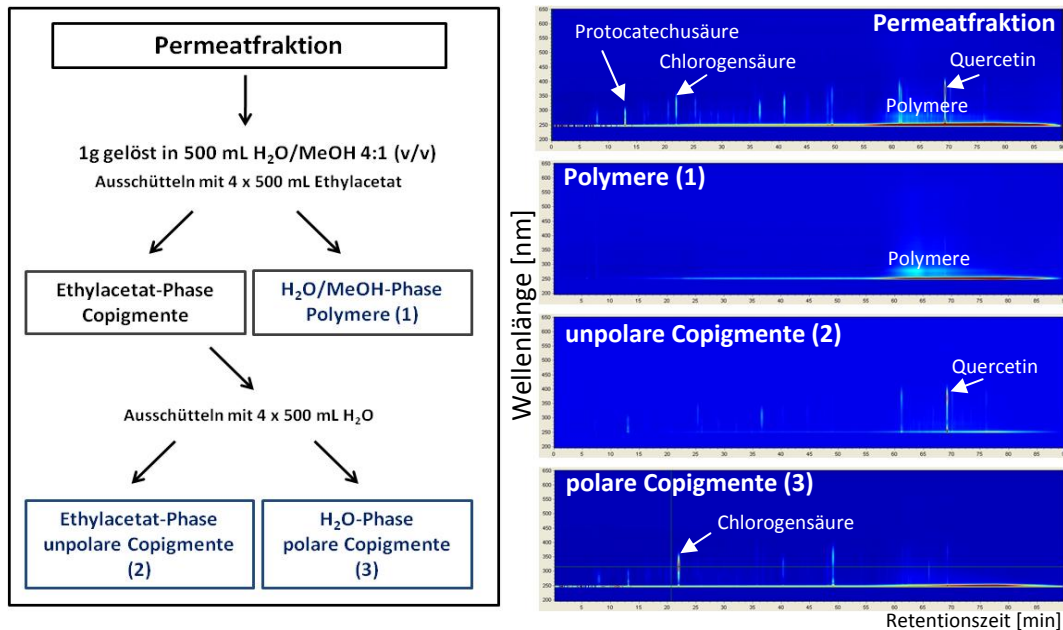


Abb. 3.77: Fraktionierungsschema der Permeatfraktion sowie HPLC-DAD-Chromatogramme der erhaltenen Subfraktionen.

Die aus der Ethylacetatphase nach Einengen im Rotationsverdampfer und Gefriertrocknung erhaltene Copigmentfraktion (15,42% Anteil am Gesamtextrakt) enthält alle in Kapitel 3.4 und in Tab. 3.6 identifizierten Copigmente, zeigt aber im HPLC-DAD-Chromatogramm keinen „Polymerhump“. Die Copigmentfraktion kann anschließend durch Lösen in Ethylacetat und Ausschütteln gegen H₂O weiter fraktioniert werden. Es wird jeweils eine Fraktion mit den angereicherten polareren Copigmenten (z. B. Chlorogensäure) sowie eine Fraktion mit den unpolareren Copigmenten (z. B. Quercetin und Myricetin) erhalten.

Das in Abb. 3.78 gezeigte Fließschema gibt einen Gesamtüberblick über die Fraktionierung des Heidelbeerextraktes und zeigt die Massenanteile [%] der Subfraktionen am Gesamtextrakt. Durch Membranchromatographie und anschließende Entfernung des Salzes (Adsorption an Amberlite® XAD-7, siehe Kapitel 5.4.6) wird die Anthocyanfraktion mit 37,05% Anteil am Gesamtextrakt, sowie die Permeatfraktion mit 49,82% am Gesamtextrakt erhalten. Aus der Permeatfraktion werden die Copigmente (15,24% Anteil am Gesamtextrakt) von den polymeren Bestandteilen (29,40% Anteil am Gesamtextrakt) durch Extraktion abgetrennt. Durch Fällung können die Polymere und durch einen weiteren Extraktionsschritt die Copigmente in jeweils einer polaren und einer unpolareren Fraktion angereichert werden. Die Tab. 3.14 zeigt die mittels HPLC-DAD ermittelten Gehalte an Anthocyanen und Copigmenten in den einzelnen Subfraktionen.

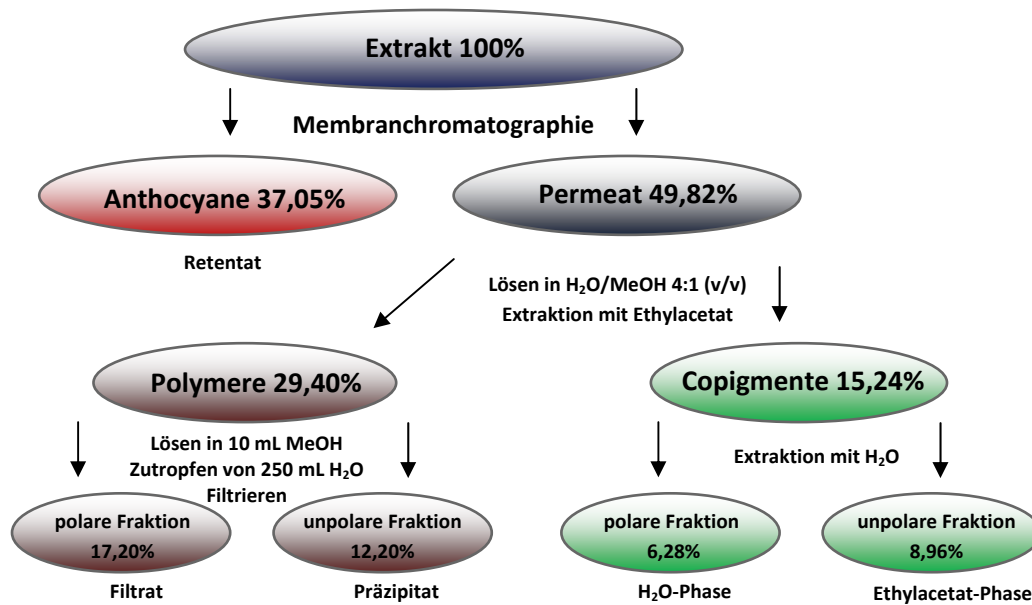


Abb. 3.78: Fraktionierungsschema und prozentuale Massenanteile der Subfraktionen des Heidelbeerextraktes.

Tab. 3.14: Vergleich der Gehalte an Anthocyanen, Anthocyanidinen und Copigmenten in den Subfraktionen des Heidelbeerextraktes.

[%]	Verbindung	Extrakt	Anthocyan-Fraktion	Permeat	Polymer-Fraktionen	Copigmente		
						g	p	u
Anthocyangehalt ¹		27,62	70,93	nd	nd	nd	nd	nd
Aglykone ¹	Delphinidin	nm	0,35	nd	nd	nd	nd	nd
	Cyanidin	nm	0,29	nd	nd	nd	nd	nd
	Petunidin	0,09	0,15	nd	nd	nd	nd	nd
	Peonidin	0,03	0,05	nd	nd	nd	nd	nd
	Malvidin	0,06	0,13	nd	nd	nd	nd	nd
				nd	nd	nd	nd	nd
Chlorogensäure		1,10	nd	1,34	nd	2,68	5,82	0,48
Flavonole ²	Quercetin	0,28	nd	1,62	nd	4,97	0,44	8,15
	Quercetin-Galactosid	0,34	nd	0,23	nd	0,31	0,47	0,19
	Quercetin-Glucuronid	0,41	nd	0,57	nd	1,52	3,19	0,36
	Quercetin-Arabinosid	0,12	nd	nm	nd	0,12	0,28	nd
	Quercetin-Rhamnosid	0,12	nd	nm	nd	0,08	0,19	nd
	Myricetin	0,15	nd	0,48	nd	2,13	0,32	3,39
Phenolcarbon-säuren ³	Gallussäure	0,15	nd	0,32	nd	0,63	1,24	0,20
	Protocatechusäure	0,21	nd	0,42	nd	1,15	0,80	1,39
	5-Hydroxyvanillinsäure	0,05	nd	0,15	nd	0,34	0,35	0,33
	Vanillinsäure	nm	nd	0,14	nd	0,39	0,24	0,50
	Syringasäure	nm	nd	0,11	nd	0,27	0,18	0,35
Hydroxyzimt-säuren ³	Kaffeesäure	nm	nd	0,23	nd	0,46	0,15	0,67
	p-Cumarsäure	nm	nd	0,42	nd	1,29	0,26	2,02
sonstige ³	Depsid	0,01	nd	0,10	nd	0,19	0,19	0,20
	Cumaroyl-Iridoid	0,13	nd	0,08	nd	0,06	0,15	nd
	Cumarsäure-Derivat	0,05	nd	0,09	nd	0,13	0,31	nd

Quantifizierung erfolgte als: ¹Cyanidin-3-glucosid-Äquivalente [520 nm]; ²Quercetin-3-glucosid-Äquivalente [351 nm]; ³Gallussäure-Äquivalente [280 nm]; nd = nicht detektiert, nm = nicht möglich wegen Koelution mit Anthocyanen, g = gesamt, p = polar, u = unpolar

Durch die gezeigten Daten wird deutlich, dass es mittels der Membranchromatographie gelingt, eine sehr reine Anthocyanfraktion (Gesamtanthocyangehalt der 15 Hauptkomponenten > 70%, quantifiziert als Cyanidin-3-glc-Äquivalente, ohne Berücksichtigung des Gegenions, vergl. Kapitel 3.5.1, Seite 83, aus dem Extrakt zu isolieren. In dieser Fraktion konnten keine Copigmente detektiert werden, wie ebenfalls der Tabelle zu entnehmen ist. Dagegen konnten die Copigmente und Polymere mit der Permeatfraktion erhalten und vollständig von den im Extrakt vorhandenen Anthocyanen und Anthocyanidinen abgetrennt werden. Durch die nachfolgend durchgeführte Extraktion mit Ethylacetat konnte die Permeatfraktion vollständig in eine Polymer- sowie eine Copigmentfraktion fraktioniert werden. Somit wurde das Ziel der Entwicklung einer Methode zur vollständigen TFA-freien Fraktionierung des Extraktes in die drei Subfraktionen erreicht.

3.5.3.2 Bestimmung der antioxidativen Aktivität der Subfraktionen

Durch die erfolgreiche membranchromatographische Trennung war es erstmals möglich, die antioxidativen Aktivitäten und den Gesamtpolyphenolgehalt reiner Anthocyan-, Copigment- und Polymerfraktionen aus anthocyanhaltigen Früchten mittels TEAC-Assay (siehe Kapitel 2.3.2) und der Methode nach Folin-Ciocalteu (siehe Kapitel 2.3.1) zu bestimmen, ohne dass Rückstände der jeweiligen anderen Substanzklassen das Ergebnis verfälschen konnten.

Bei den Subfraktionen des Heidelbeerextraktes stellte sich heraus, dass die Anthocyanfraktion mit 4,6 mmol Trolox/g und einem Anteil von 37% am Gesamtextrakt den höchsten Beitrag zur antioxidativen Aktivität (3,5 mmol Trolox/g; 100%) leistet. Außerdem zeigt sich diese Fraktion mit 677 mg Gallussäure-Äquivalenten pro Gramm am aktivsten bei der Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes. Dieses Ergebnis spricht zusätzlich für die hohe Reinheit der Anthocyanfraktion. Denn die am Aglykon gebundenen Zucker der Anthocyane werden durch die Methode nach Folin-Ciocalteu nicht miterfasst, da die zum Nachweis erforderliche Farbreaktion nur am phenolischen Teil, dem Aglykon der Anthocyane stattfindet (vergl. Kapitel 2.3.1). So spricht der hohe Gesamtpolyphenolgehalt von 67%, der die konjugierten Zucker im Anthocyanmolekül unberücksichtigt lässt, für einen deutlich höheren Gesamtanthocyangehalt in dieser Fraktion. Die Copigmentfraktion zeigt mit 57,4% einen um nur 10% niedrigeren Gesamtpolyphenolgehalt, aber eine um 30% niedrigere antioxidative Aktivität (3,2 mmol Trolox/g bei einem Anteil von 15% am Gesamtextrakt). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der TEAC-Test bei ähnlichen Gesamtpolyphenolgehalten besonders empfindlich auf Anthocyane reagiert, im Vergleich zu den weiteren phenolischen Inhaltsstoffen der Heidelbeere. Insgesamt liegt die Aktivität der Copigmentfraktion jedoch noch deutlich über der antioxidativen Aktivität des Gesamtextraktes. Den geringsten Beitrag zur antioxidativen Aktivität und zum Gesamtpolyphenolgehalt liefert die Polymerfraktion mit 2,1 mmol Trolox/g bei 29% Anteil am Gesamtextrakt. Damit ist die Polymerfraktion für die niedrigere antioxidative Aktivität des Gesamtextraktes gegenüber der reinen Copigment- und Polymerfraktion verantwortlich. Somit zeigen die durchgeführten Untersuchungen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Fraktionierung des Extraktes mittels HSCCC (vergl. Kapitel 3.2.2.1), dass vor allem die Anthocyane und die Copigmente für die hohe antioxidative Aktivität des Heidelbeerextraktes verantwortlich sind.

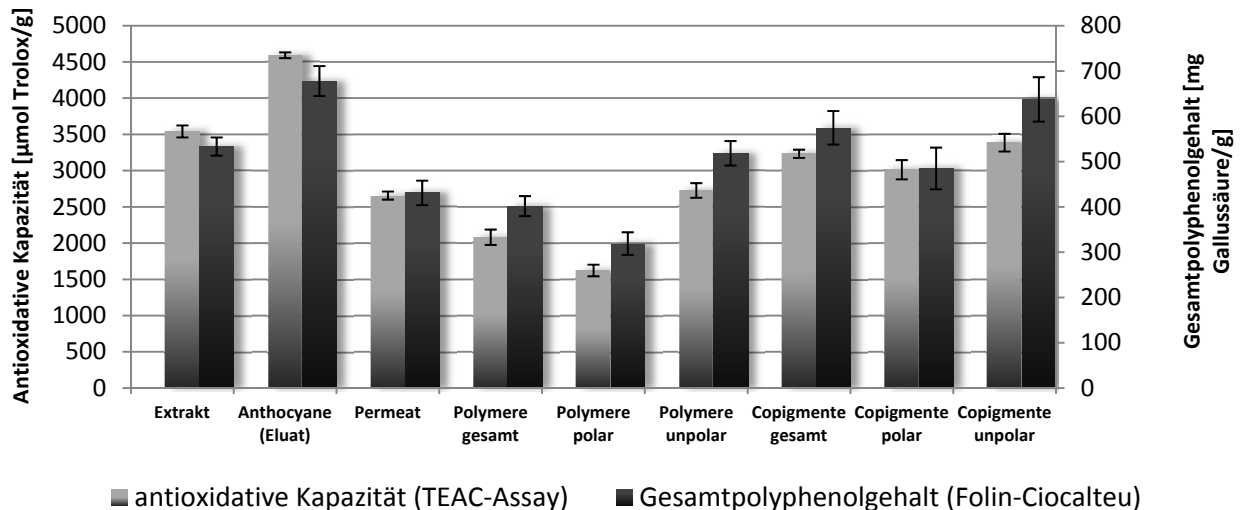


Abb. 3.79: Antioxidative Aktivität und Gesamtpolyphenolgehalt der Subfraktionen des Heidelbeerextraktes nach Fraktionierung mittels Membranchromatographie und Lösungsmittelfällungen.

Ziel dieser Untersuchung war es, durch die antioxidative Aktivität erste Hinweise auf die im Heidelbeerextrakt wirksamen bioaktiven Substanzen und Substanzklassen zu erhalten. Im Rahmen des Clusterprojektes „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“ sollten die empfindlichen bioaktiven Inhaltsstoffe der Heidelbeere zunächst isoliert, charakterisiert und durch Mikroverkapselung stabilisiert werden, um nach oraler Aufnahme erst an den gewünschten Wirkorten im Magen-Darm-Trakt freigesetzt zu werden. Im Rahmen der einzelnen Teilprojekte, die sich mit der Verkapselung der Inhaltsstoffe beschäftigten, war ein großes Problem, den Extrakt möglichst in wirksamen Konzentrationen in die verschiedenen Verkapselungssysteme einzubringen. Die gezeigten Ergebnisse zur antioxidativen Aktivität lieferten nun erstmals die Möglichkeit, die bioaktiven Inhaltsstoffe in reiner Form und somit in hoher Konzentration zu verkapseln. Da die neue Methode zur Isolierung der bioaktiven Verbindungen ohne die Verwendung giftiger Reagenzien auskommt und auch im Großmaßstab durchgeführt werden kann, dürfte sie auch für die industrielle Anwendung in der Nahrungs- und Nahrungsergänzungsmittel- oder pharmazeutischen Industrie von Interesse sein. Durch den Ausschluss von giftigen Rückständen durch die neue Fraktionierungsmethode bestand weiterhin erstmals die Möglichkeit, die Subfraktionen des Extraktes im Rahmen von Bio-Assays zu vergleichen und zu testen. Dabei stellte sich heraus, dass ausschließlich bei der Inkubation mit der Copigmentfraktion positive Effekte auf die untersuchten Biomarker in Caco-2-Zellen (Darmkrebszellen) nachgewiesen werden konnten (FEI).

Sicherlich sind dies nur die ersten Hinweise auf die Wirksamkeit der einzelnen Verbindungen und Stoffklassen im Heidelbeerextrakt. Durch die neuartige membranchromatographische Fraktionierungsmethode wird es aber in Zukunft möglich sein, nicht nur bei der Bewertung der Heidelbeerpolyphenole Fortschritte zu erzielen, sondern auch phenolische Inhaltsstoffe weiterer Pflanzen zu fraktionieren und hinsichtlich ihrer Bioaktivität zu untersuchen. Einige Anwendungsbeispiele für diese neue Möglichkeit der Fraktionierung werden im nächsten Kapitel gezeigt.

3.5.4 Anwendungsbeispiele zur Membranchromatographie

3.5.4.1 *Fraktionierung phenolischer Verbindungen aus frischen Früchten*

Nicht nur kommerzielle Naturstoffextrakte, sondern auch frische Früchte oder Saftkonzentrate können als Ausgangsmaterial für die Anreicherung von phenolischen Komponenten und zur anschließenden Fraktionierung mittels Membranchromatographie verwendet werden. Dazu müssen die in den Früchten enthaltenen Polyphenole zunächst extrahiert und im Anschluss durch Adsorption an Amberlite® XAD-7 angereichert werden. In Kapitel 3.1.4 wurde letzteres durch die Herstellung eines Heidelbeerextraktes aus Saftkonzentrat und aus frischen Heidelbeeren gezeigt und festgestellt, dass sich diese Extrakte in ihrer Zusammensetzung nur gering von dem zur Fraktionierung verwendeten kommerziellen Extrakt unterscheiden.

Zur Herstellung der zur Fraktionierung vorgesehenen Extrakte wurde das Saftkonzentrat mit Wasser verdünnt und zur Anreicherung der Polyphenole direkt auf die XAD-7-Säule gegeben. Die frischen Früchte mussten dagegen zunächst mit Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) bzw. Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v) extrahiert werden. Theoretisch können diese Rohextraktlösungen direkt für die membranchromatographische Trennung eingesetzt werden. Doch es hat sich bei zahlreichen Versuchen gezeigt, dass es von Vorteil ist, zunächst alle Salze bzw. alle positiv geladenen Ionen, die Einfluss auf die Trennung haben können, aus dem Rohextrakt zu entfernen. Trennungen von Rohextrakten aus z. B. Granatäpfeln, welche sehr viel Kalium enthalten, sind sonst nicht realisierbar, weil zunächst bevorzugt die Kalium⁺-Ionen anstatt der Anthocyane an der Membranoberfläche adsorbiert werden (vergl. Kapitel 3.5.4.5). Deshalb empfiehlt es sich, die Rohextrakte zunächst vollständig am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel zu befreien und anschließend die Polyphenole durch Adsorption an Amberlite® XAD-7 anzureichern und von den störenden Salzen und Zuckern nach der Methode in Kapitel 5.4.5 zu befreien. Anschließend steht einer erfolgreichen membranchromatographischen Trennung nichts mehr im Wege. Da die Elution der Anthocyane von der XAD-7 Säule mit Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) bzw. Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v) erfolgt, hat es sich als praktisch erwiesen, diese Elutionslösung direkt für die membranchromatographische Trennung einzusetzen. Voraussetzung ist allerdings eine schnelle Weiterverarbeitung der Elutionslösung aufgrund der in Lösung nicht sehr stabilen Inhaltsstoffe. Außerdem hat es sich gezeigt, dass die Trennung nach längeren Standzeiten der methanolisch bzw. ethanolisch sauren Extraktlösung nicht mehr optimal funktioniert, weil es zu einer Verringerung der dynamischen Bindungskapazitäten des Adsorbens für die Anthocyane kommt. Erklärbar ist dies durch die Reaktion der Säure mit dem Alkohol, die zu einem Anstieg des pH-Wertes der Lösung führt, wodurch das Gleichgewicht der Flavylumkationen und der nichtgeladenen pH-abhängigen Formen der Anthocyane zu Ungunsten der Flavylumkationen verschoben wird.

Unter Berücksichtigung der genannten Faktoren konnten jedoch die XAD-7 Extrakte aus Säften, Saftkonzentraten und frischen Früchten genauso erfolgreich mittels Membranchromatographie in eine Anthocyan-, eine Copigment- und eine Polymerfraktion getrennt werden wie der kommerzielle Heidelbeerextrakt.

3.5.4.2 Membranchromatographie eines Heidelbeersaftes

Auch Fruchtsäfte, hier gezeigt anhand der Membranchromatographie eines Heidelbeersaftes, können mittels der entwickelten membranchromatographischen Methode entfärbt und die darin enthaltenen Anthocyane aus dem Saft isoliert werden. Voraussetzung ist eine gründliche Vorfiltration der Säfte, um Zellbestandteile und andere im Saft vorhandene Partikel, die zu einem Verstopfen der Membran führen können, zu entfernen. Dazu wurde der Saft, wie im Kapitel 5.3.9.1 beschrieben, zunächst mit einem Faltenfilter und anschließend einer Sartopore 2 300 filter capsule vorfiltriert.

Die Equilibrierung des Adsorbers (siehe Kapitel 5.4.3.2) erfolgte bei Säften nicht mit dem ethanolischen bzw. methanolischen Extraktlösungsmittel. Stattdessen wurde nur mit 0,01 M HCl equilibriert und anschließend der Saft aufgegeben. Durch zweifache Membranchromatographie ließen sich über 97% der Anthocyane aus dem Saft entfernen, wie aus der Abb. 3.80 hervorgeht.

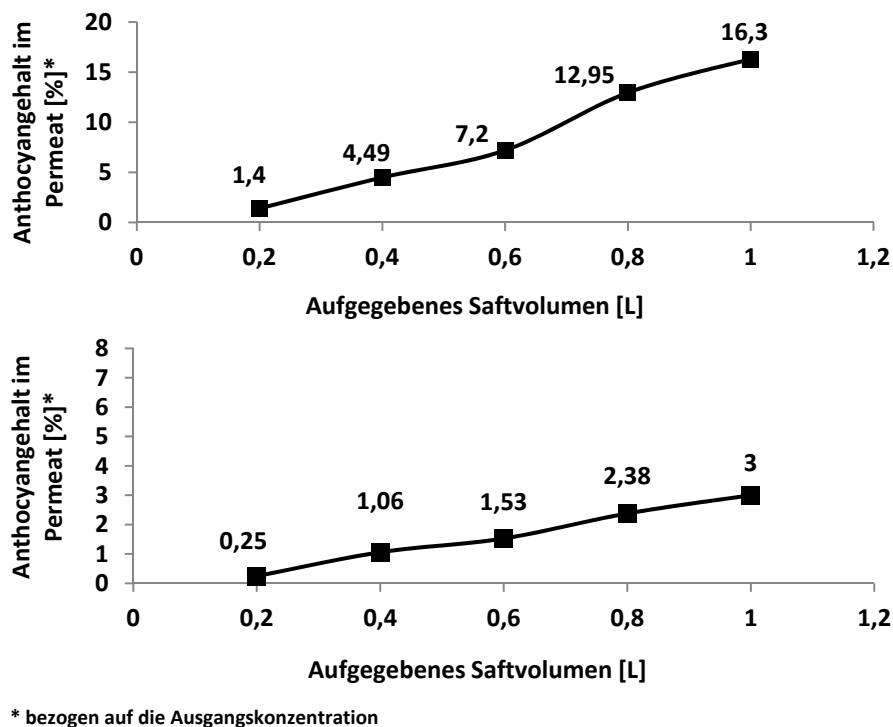


Abb. 3.80: Anthocyanretention während der ersten (oben) und zweiten (unten) Membranchromatographie eines Heidelbeersaftes.

Zwar wird während der Membranchromatographie von 1 L des Saftes im ersten Durchlauf der 10%-Wert und damit die dynamische Bindungskapazität des Adsorbers überschritten, jedoch kann durch die zweite Trennung der Restanthocyangehalt im Permeat auf einen akzeptablen Wert von unter 3% gesenkt werden. Dieser Unterschied zu wässrigen Extraktlösungen lässt sich entweder durch eine höhere Konzentration an Kationen im Heidelbeersaft, oder durch den höheren pH-Wert des Saftes (pH 3) gegenüber den mit HCl angesäuerten Extraktlösungen (pH 2) erklären. Bei Heidelbeersäften scheint vor allem letzteres der Fall zu sein. So gelang es durch Ansäuern des Saftes mit HCl auf pH 2 die Konzentration der Flavylumkationen soweit zu erhöhen, dass während der ersten membranchromatographischen Trennung die dynamische Bindungskapazität des Adsorbers für Anthocyane nicht mehr überschritten wird. Dadurch konnten durch zweifache Membranchromatographie über 99% der enthaltenen Anthocyane aus dem Saft entfernt werden. In

erster Linie wurde die Trennung eines Heidelbeersaftes jedoch durchgeführt, um einen originären Saft lediglich von den enthaltenen Anthocyanen zu befreien. Deshalb kam ein Ansäuern des Saftes mittels HCl nicht in Frage. Der durch zweifache Membranchromatographie bis auf 97% entfärbte originäre Saft wurde anschließend im Rahmen des Clusterprojektes „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“ zur Untersuchung des Einflusses der Verkapselung auf die Lagerstabilität von Anthocyanen genutzt. Dazu wurden verkapselte und unverkapselte Anthocyane in den entfärbten Saft für Lagerungsversuche eingebracht (FEI).

Durch die membranchromatographische Entfärbung eines Heidelbeersaftes wurde die Möglichkeit zur erfolgreichen Adsorption von Anthocyanen mittels Sartobind® S Membranadsorbern auch aus Säften gezeigt. Somit eignen sich Säfte selbstverständlich auch als Ausgangsmaterial für die Isolierung der Anthocyane, vorausgesetzt, sie werden einer gründlichen Vorfiltration unterzogen. So konnten nach Elution der Anthocyane von der Adsorbereinheit und nach erfolgreicher Eliminierung des in der Anthocyanfraktion enthaltenen NaCl 2,2 g Anthocyane aus 1 L frischem Heidelbeersaft gewonnen werden. Das Anthocyanprofil der gewonnenen Fraktion stimmte mit dem Anthocyanprofil des frischen Saftes und mit dem Anthocyanprofil frischer Wildheidelbeeren (siehe Kapitel 3.1.2) überein. Die Anthocyanfraktion zeigte einen mittels HPLC als Cyanidin-3-glucosid-Äquivalente bestimmten Gesamtanthocyangehalt von 81%.

3.5.4.3 Fraktionierung phenolischer Verbindungen aus Hibiskus

Extrakte aus Hibiskus werden aufgrund ihres Anthocyangehaltes analog den Heidelbeerextrakten zum Färben von Lebensmitteln verwendet und sollen aufgrund ihres hohen Polyphenolgehaltes ebenfalls eine ganze Reihe von gesundheitsfördernden Wirkungen besitzen (Al-Kahtani und Hassan, 1990; Bridle und Timberlake, 1997). So wird der Hibiskus in der Volksmedizin als Heilmittel für hohen Blutdruck, Lebererkrankungen und Fieber eingesetzt. Einige wissenschaftliche Studien an Ratten konnten bereits die Schutzfunktion des Extraktes gegen die Auswirkungen von oxidativen Stress an Hepatozyten bestätigen (Tseng et al., 1997; Wang et al., 2000). Ebenfalls wurden blutdrucksenkende Eigenschaften nachgewiesen (Adegunloye et al., 1996; Haji Faraji und Haji Tarkhani, 1999). Für diese Studien wurden nur die Extrakte, jedoch keine einzelnen Stoffklassen aus den Extrakten herangezogen. Damit stellt sich die interessante Frage nach den für diese Effekte verantwortlichen Inhaltsstoffen bzw. Inhaltsstofffraktionen. Nicht nur aus diesem Grund ist eine Fraktionierung von Extrakten aus Hibiskus mittels Membranchromatographie sinnvoll. Der Hibiskus enthält bei weitem nicht so viele Anthocyane wie die Heidelbeere. Bei einem Gesamtpolyphenolgehalt von 2,99% (als Gallussäure-Äquivalente) quantifizierten Sukwattansinit et al. (2007) einen Gesamtanthocyangehalt von 1,80%, bezogen auf das Trockengewicht roter Hibiskusblüten. Hauptkomponenten unter den Copigmenten des Hibiskus sind Chlorogensäure-Derivate. In wässrigen Blütenextrakten stellten Ramiriz-Rodriguez et al. (2011) einen Chlorogensäure-Gesamtgehalt von 132-142 mg/L sowie einen Anthocyan-Gesamtgehalt von 129-146 mg/L bezogen auf das Trockengewicht der Extrakte fest. Eine erfolgreiche Trennung solcher Extrakte wäre deshalb nicht nur für Studien der biologischen Wirksamkeit einzelner Extraktfraktionen interessant, sondern auch, um eine geeignete Methode aufzuzeigen, die Anthocyane als färbende Komponenten für die Nahrungsmittelindustrie anzureichern. Gelingt dies, wäre die Membranchromatographie außerdem ein unverzichtbares Verfahren bei der Gewinnung von Anthocyanen als Standard oder Referenzsubstanzen. Denn sie ist die einzige Möglichkeit, die Anthocyane schnell und selektiv von den Chlorogensäuren und anderen phenolischen Inhaltsstoffen abzutrennen, da dies mittels HSCCC und präp. HPLC aufgrund der sehr ähnlichen Polaritäten nur sehr schlecht und unter großem Arbeitsaufwand möglich ist.

Bei dem für die Membranchromatographie vorgesehenen kommerziellen Hibiskus-Rohextrakt (siehe Kapitel 5.1.2) handelte es sich um eine sirupartige zähflüssige rote Masse. Er unterscheidet sich in Aussehen, Konsistenz und Polyphenolgehalt nicht von einem durch methanolische Extraktion aus Hibiskusblüten gewonnenen Rohextrakt (siehe Kapitel 5.4.4).

Für die Trennung der phenolischen Verbindungen mittels Membranchromatographie mussten diese zunächst säulenchromatographisch mittels Amberlite® XAD-7 angereichert und von störenden Begleitsubstanzen wie Zuckern, Säuren und Salzen befreit werden. Unter Verwendung der in Kapitel 5.4.5 beschriebenen Methode sowie des in Abb. 3.81 gezeigten Fließschemas wurden 25 g XAD-7 Extrakt aus insgesamt 500 g Hibiskus-Rohextrakt erhalten.

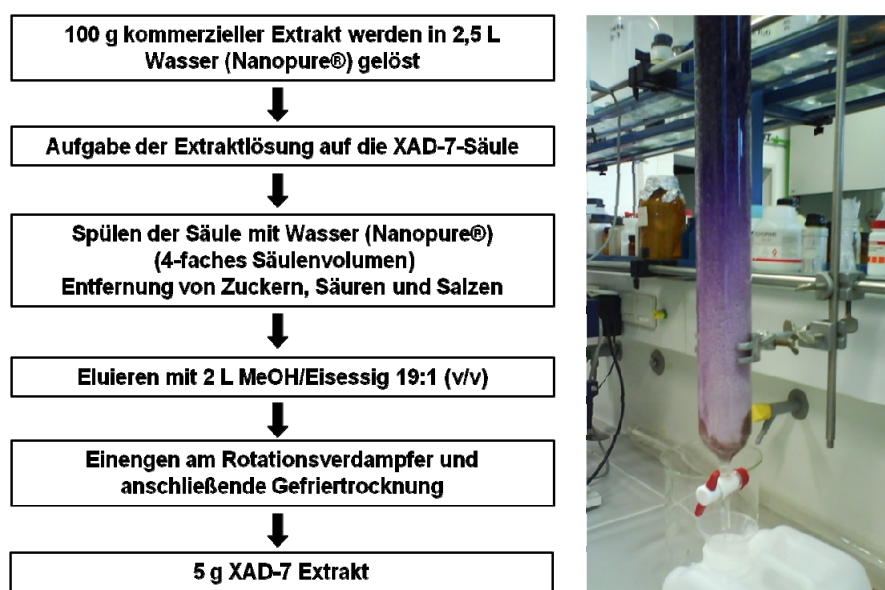


Abb. 3.81: Fließschema zur Anreicherung phenolischer Komponenten aus Hibiskus-Rohextrakt.

Der gefriergetrocknete XAD-7-Extrakt wurde mittels HPLC-DAD-ESI-MS charakterisiert. Abb. 3.82 zeigt das HPLC-DAD-Chromatogramm sowie die im negativen (a) und positiven (b) Modus erhaltenen Base Peak Chromatogramme des Hibiskusextraktes. Mittels der erhaltenen UV-Spektren, der Fragmentierungsmuster und dem Vergleich mit den in der Literatur gefundenen Daten (Clifford et al., 2003; Rodríguez-Medina et al., 2009) konnten die in Tab. 3.15 und Abb. 3.83 gezeigten, für Hibiskus typischen, Verbindungen im Extrakt identifiziert werden.

Die zwei für die Farbe des Hibiskusextrakts verantwortlichen Hauptverbindungen sind die Anthocyane Delphinidin-3-sambubiosid und Cyanidin-3-sambubiosid. Unter den Copigmenten sind vor allem die Chlorogensäuren als Hauptkomponenten zu nennen, während Flavonole, darunter überwiegend Quercetinderivate, in nur sehr geringer Konzentration nachweisbar waren. Auch nichtphenolische Verbindungen wie Hydroxycitronensäure und Hibiskussäure konnten mittels HPLC-ESI-MS im Extrakt detektiert werden.

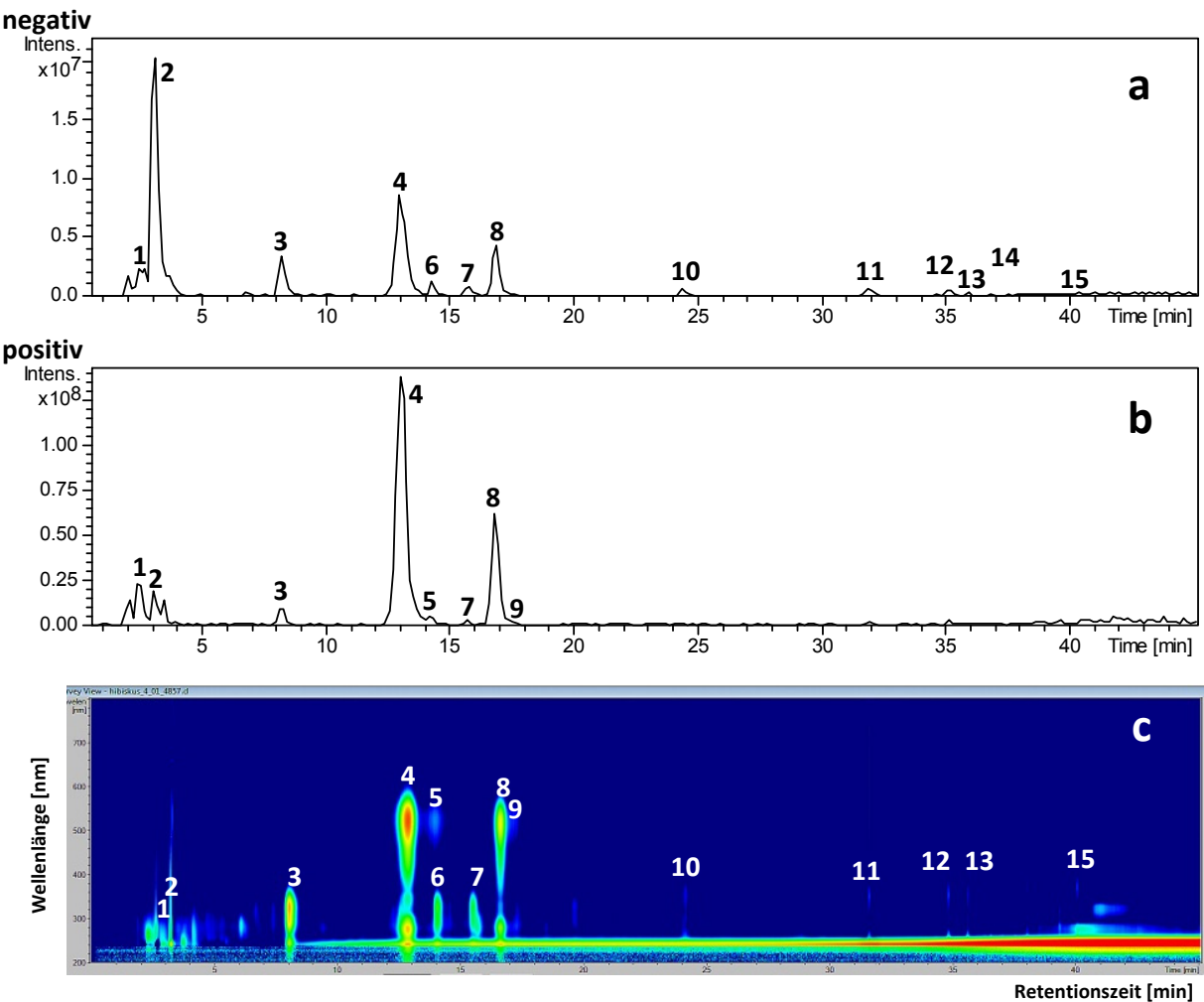


Abb. 3.82: Base Peak Chromatogramme (negativer (a) und positiver (b) Modus) sowie HPLC-DAD-Chromatogramm (c) des Hibiskusextraktes. Zuordnung der Peaks nach Tab. 3.15.

Tab. 3.15: HPLC-DAD und HPLC-ESI MS Daten der im Hibiskusextrakt identifizierten Verbindungen

Peak	R _t [min]	UV [nm]	[M-H] ⁻ m/z	MS ² m/z	Modus	Verbindung
1	2,8	-	207	189, 127	(-)	Hydroxycitronensäure
2	3,2	-	189	127	(-)	Hibiskussäure
3	8,3	297, 324	353	191, 179, 135	(-)	3-Caffeoyl-(-)-Chinasäure
4	13,1	520, 280	597	303	(+)	Delphinidin-3-sambubiosid
5	14,2	520, 280	465	303	(+)	Delphinidin-3-glucosid
6	14,3	297, 324	353	191, 171, 127	(-)	5-Caffeoyl-(-)-Chinasäure
7	15,8	297, 324	353	173, 135	(-)	4-Caffeoyl-(-)-Chinasäure
8	16,8	520, 280	581	287	(+)	Cyanidin-3-sambubiosid
9	17,1	520, 280	449	287	(+)	Cyanidin-3-glucosid
10	24,3	352	611	317, 316	(-)	Myricetin-3-arabinogalactosid
11	31,7	345	595	463, 445, 301	(-)	Quercetin-3-sambubiosid
12	35,0	255, 353	609	301	(-)	Quercetin-3-rutinosid
13	35,8	253, 356	463	301	(-)	Quercetin-3-glucosid
14	36,8	265, 350	593	285	(-)	Kaempferol-3-rutinosid
15	40,3	253, 372	301	179, 151	(-)	Quercetin

Einen Überblick über die Strukturformeln der Verbindungen und Verbindungsklassen des Hibiskusextraktes zeigt die folgende Abb. 3.83.

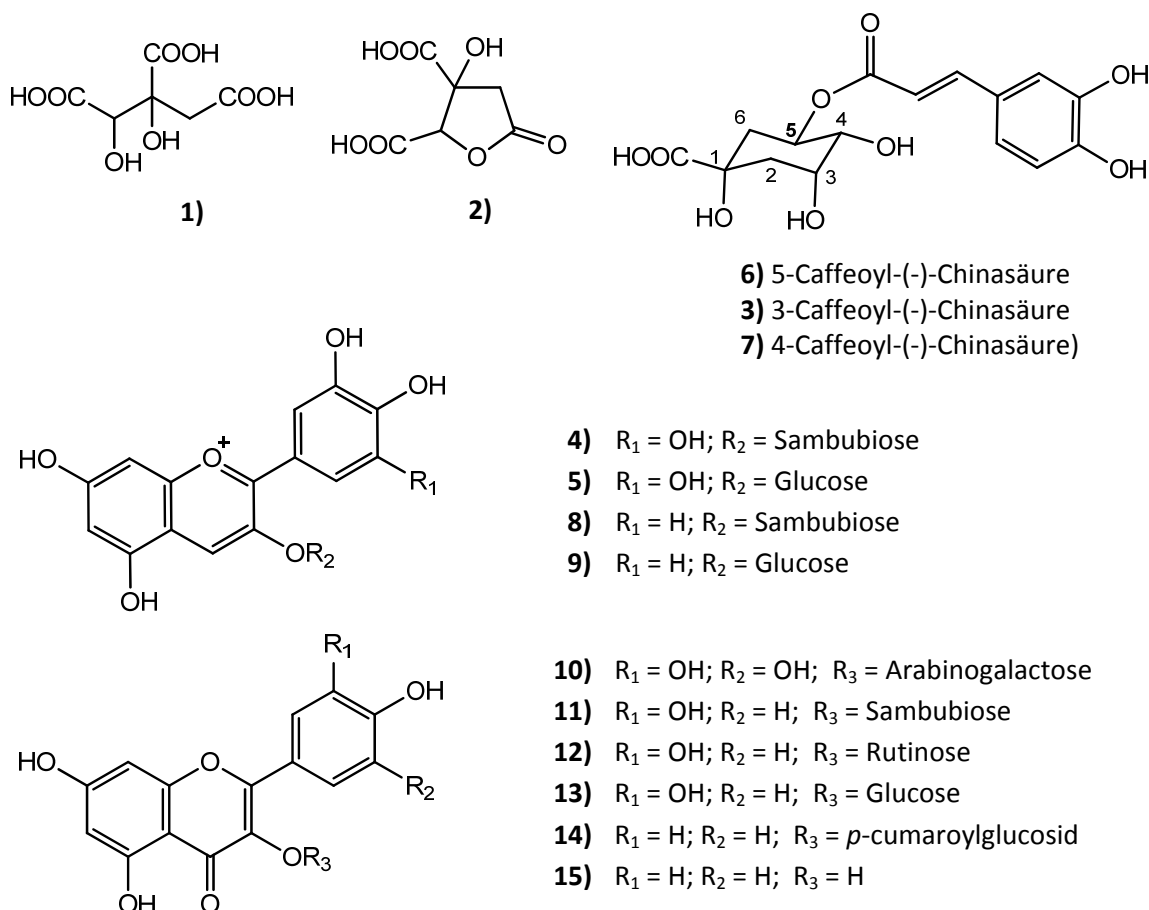
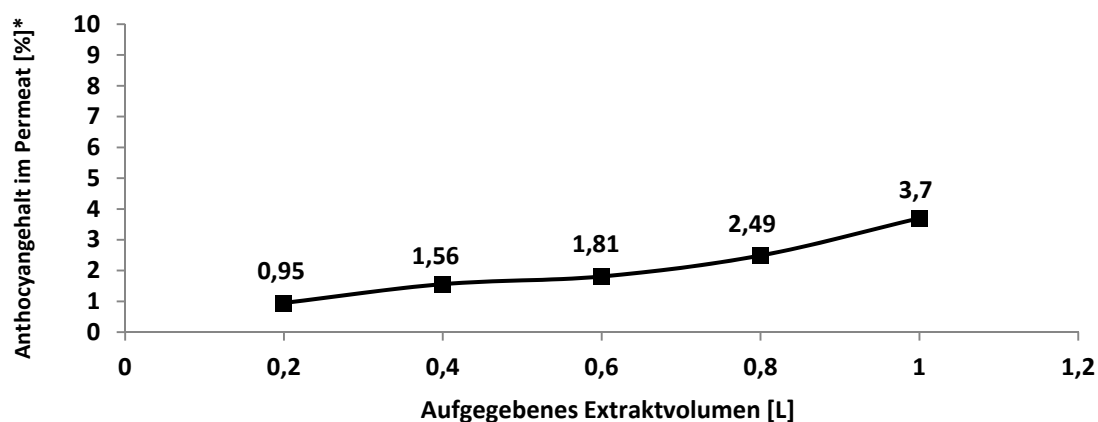


Abb. 3.83: Überblick über die chemischen Strukturen der Verbindungen des Hibiskusextraktes. Nummerierung analog Tab. 3.15.

Zur membranchromatographischen Trennung wurden 6 g des Extraktes in 1 L Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) gelöst und nach dem in Abb. 3.66 gezeigten Fließschema sowie unter Verwendung der in Kapitel 5.4.3.2 beschriebenen Methode fraktioniert. In Abb. 3.84 ist die Anthocyankonzentration in der Durchflussfraktion (Permeat) während der Beladung des Adsorbers dargestellt.



* bezogen auf die Ausgangskonzentration

Abb. 3.84: Retention der Anthocyane während der Membranchromatographie eines Hibiskusextraktes.

Die dynamische Bildungskapazität des Adsorbers wurde nicht überschritten und es gelangten maximal 3,7% der mit der Extraktlösung ursprünglich aufgegebenen Anthocyane in das Permeat. Durch eine wiederholte membran chromatographische Trennung konnte der Restanthocyangehalt im Permeat sogar auf 0,07% der ursprünglichen Extraktkonzentration gesenkt werden. Die im Extrakt enthaltenen Chlorogensäuren passieren dagegen den Membranadsorber weitestgehend ungehindert, so dass mehr als 95% der ursprünglichen aufgegebenen Konzentration in das Permeat gelangte, siehe Abb. 3.85.

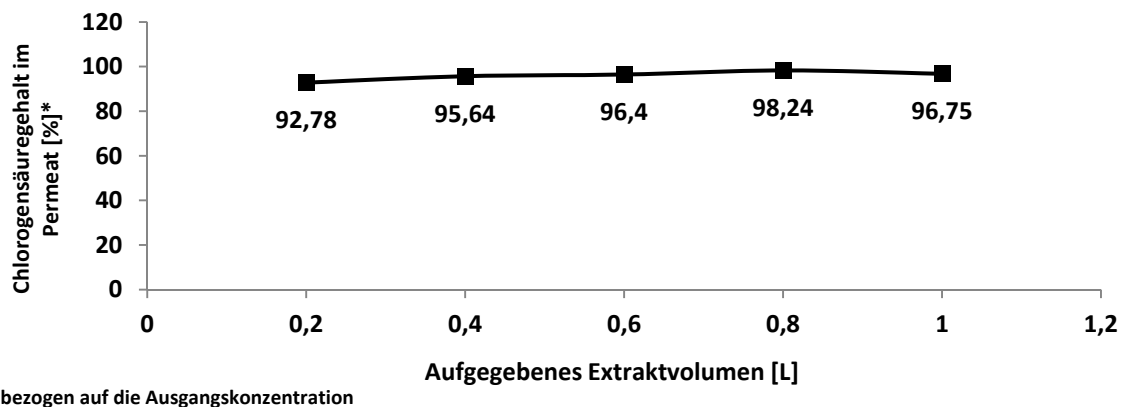


Abb. 3.85: Retention der Chlorogensäuren während der Membranchromatographie eines Hibiskusextraktes.

Nach dem Spülschritt konnten die Anthocyane mit 1L der NaCl-haltigen Elutionslösung nahezu vollständig von der Adsorbereinheit eluiert werden, wie die Elutionskurve in Abb. 3.86 verdeutlicht. Durch Elimination des Salzes (siehe Kapitel 5.4.6) und anschließender Gefriertrocknung wurden 3 g der Anthocyanfraktion und 2,6 g der Copigmentfraktion erhalten.

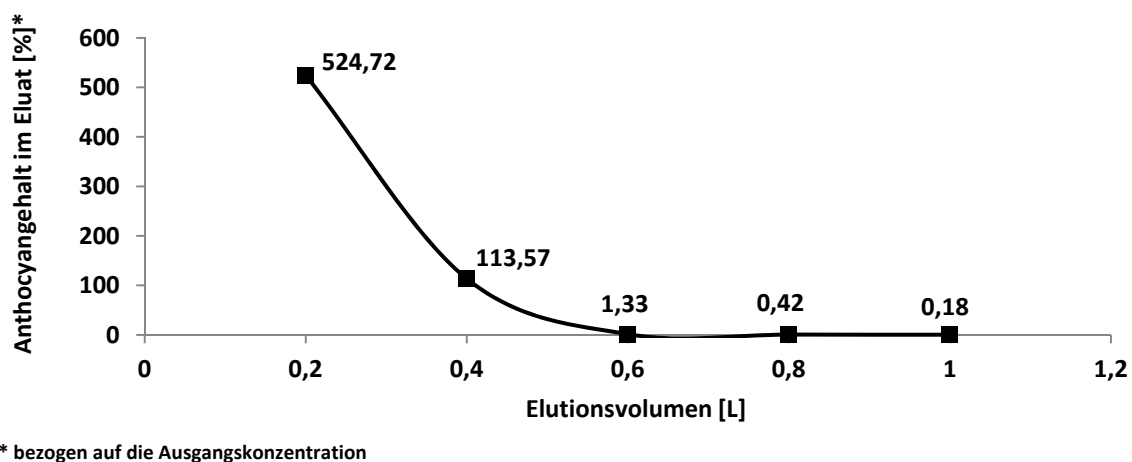


Abb. 3.86: Elutionskurve der Hibiskus-Anthocyane mit der NaCl-haltigen methanolischen Elutionslösung von der Membranadsorbereinheit.

Die Anthocyanfraktion zeigte einen Gehalt von 70% an Del-3-samb und 22,5% an Cy-3-samb. In der Copigmentfraktion kann der Restanthocyangehalt von 0,1% praktisch nicht mehr im HPLC-DAD-Chromatogramm sichtbar gemacht werden (siehe Abb. 3.87). Durch präparative HPLC konnten die Anthocyane isoliert und in Reinheiten > 98% gewonnen werden. So konnte auch anhand der Membranchromatographie eines Hibiskusextraktes gezeigt werden, dass die selektive Trennung von

Anthocyanen und Copigmenten funktioniert und sich auch auf weitere Naturstoffextrakte übertragen lässt. Die Membranchromatographie stellt somit einen wichtigen Schritt zur Aufkonzentrierung und Isolierung von Anthocyanen dar.

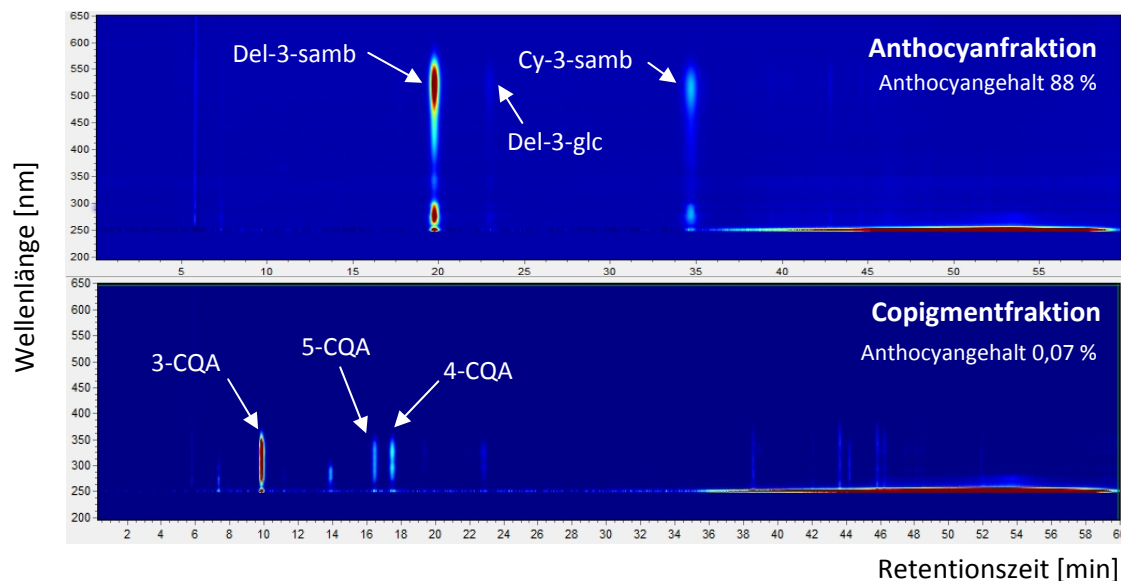


Abb. 3.87: HPLC-DAD-Chromatogramme der nach Membranchromatographie erhaltenen Subfraktionen des Hibiskusextraktes.

Im TEAC-Assay zeigten beide Subfraktionen nur geringe Unterschiede hinsichtlich ihrer antioxidativen Aktivitäten im Vergleich zum Gesamtextrakt. Anders als bei den Heidelbeeren war die Copigmentfraktion mit 1,95 mmol Trolox/g fast genauso aktiv wie die Anthocyanfraktion mit 2,06 mmol Trolox/g. Der Extrakt zeigte eine antioxidative Aktivität von 2,03 mmol Trolox/g.

Die geringere antioxidative Aktivität der Anthocyanfraktion aus Hibiskus gegenüber den Anthocyanen aus der Heidelbeere ist darauf zurückzuführen, dass der Hibiskus hauptsächlich Delphinidin- und Cyanidin-Sambubiosid enthält. Zwar handelt es sich bei Delphinidin und Cyanidin um die Aglykone mit den höchsten Aktivitäten (Rice-Evans et al., 1996) unter den Anthocyanen, im Gegensatz zu den Heidelbeeranthocyanen, bei denen es sich ausschließlich um Monoglykoside handelt, besitzen die Hibiskus-Anthocyane allerdings einen Sambubiose-Rest aus zwei Zuckerbausteinen, der nicht zur antioxidativen Aktivität beiträgt. Die Copigmentfraktion beinhaltet dagegen hauptsächlich die Chlorogensäuren. Diese zeigen im TEAC-Test nicht so hohe antioxidative Aktivitäten wie die in der Copigmentfraktion der Heidelbeere in größeren Mengen vorkommenden Quercetinderivate. Welche dieser Fraktionen und Verbindungen jedoch für die gesundheitlich positiven Wirkungen des Hibiskusextraktes verantwortlich ist, muss noch im Rahmen weiterer biologischer Studien geklärt werden. Mit der Entwicklung der membranchromatographischen Methode zur vollständigen Fraktionierung polyphenolreicher Extrakte und Isolierung von Anthocyanen konnte allerdings ein dafür notwendiger erster Schritt als Voraussetzung für die späteren Untersuchungen der Subfraktionen realisiert werden.

3.5.4.4 Isolierung von Cyanidin-3-glucosid aus Brombeeren

Als ein weiteres Anwendungsbeispiel für die Membranchromatographie soll die Isolierung reiner Anthocyanstandards aus Beerenfrüchten oder anderen anthocyanhaltigen Naturstoffextrakten dienen, hier gezeigt am Beispiel der Isolierung von reinem Cyanidin-3-glc aus Brombeeren. Solche Anthocyanstandards, mit Reinheiten > 95%, z. B. für die Quantifizierung mittels HPLC, sind aufgrund des sehr großen Aufwandes bei der Isolierung nicht gerade kostengünstig. Anhand der folgenden Ergebnisse soll nun gezeigt werden, dass es mittels der Membranchromatographie gelingt, mit einem relativ geringem Kosten- und Arbeitsaufwand größere Mengen an Cyanidin-3-glc aus Brombeeren mittels Membranchromatographie zu gewinnen.

Zunächst wurde durch methanolische Extraktion (siehe Kapitel 5.4.4) aus 8 kg frischen Brombeeren ein Rohextrakt hergestellt. Durch Adsorption der Polyphenole aus dem Rohextrakt an Amberlite® XAD-7 (siehe Kapitel 5.4.5) wurden 25 g des XAD-7-Extraktes erhalten. Dieser Extrakt enthält neben Cyanidin-3-glucosid als Hauptanthocyan noch eine ganze Menge an Copigmenten, die aufgrund ihrer sehr ähnlichen Polaritäten eine Aufreinigung des Cyanidin-3-glucosids mittels präparativer HPLC erschweren (siehe Abb. 3.88). Zudem wäre eine präparative Aufreinigung von Mengen im Gramm-Bereich, wie sie z. B. zum Einsatz für *in vivo*- Studien benötigt werden, aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes und der entstehenden Kosten kaum zu bewerkstelligen.

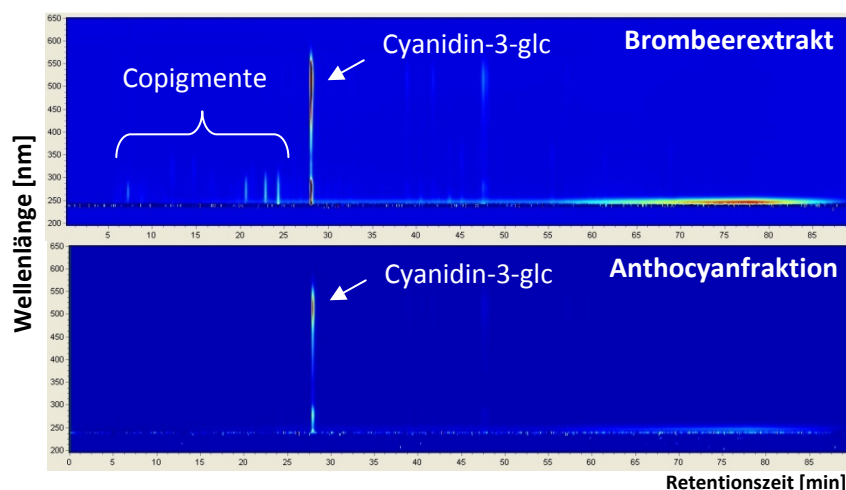
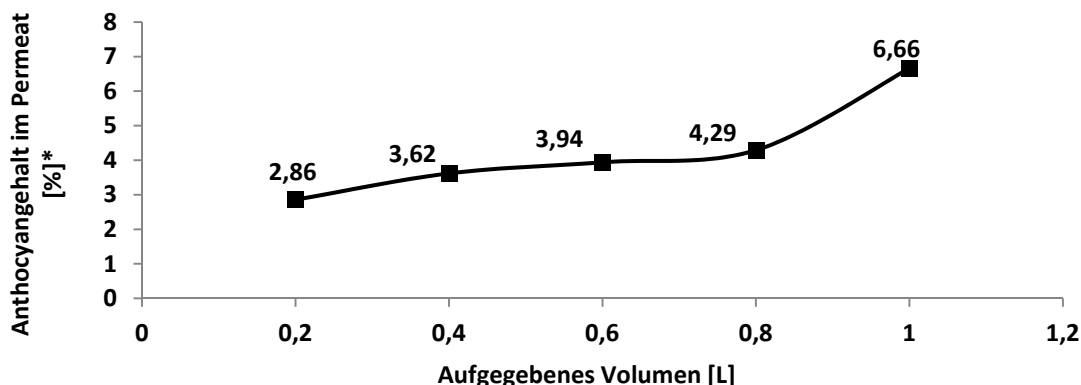


Abb. 3.88: HPLC-DAD-Chromatogramme des XAD-7 Extraktes aus frischen Brombeeren sowie aus der durch Membranchromatographie gewonnenen Anthocyanfraktion.

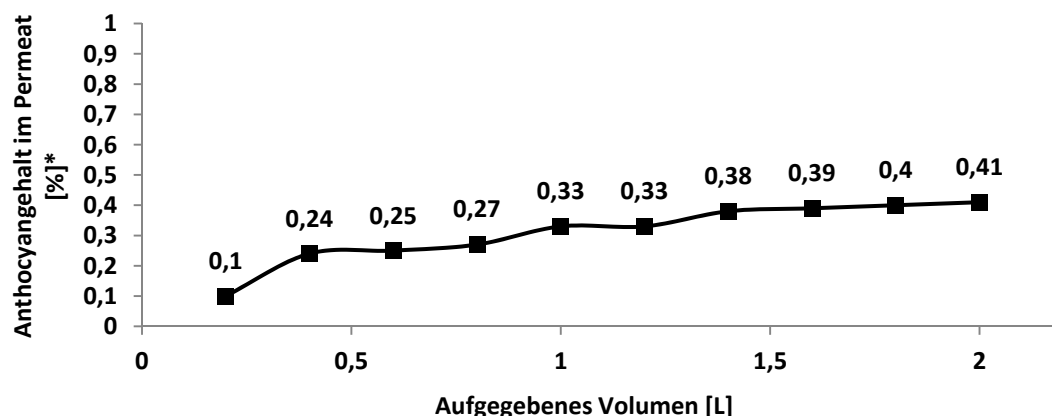
Eine weitere Möglichkeit zur Abtrennung der Copigmente und Isolierung des Cyanidin-3-glucosids wäre eine gegenstromverteilungschromatographische Trennung, wie sie von Schwarz et al. (2003) erfolgreich durchgeführt wurde. Hierbei war es möglich, 330 mg Cyanidin-3-glucosid aus frischen Brombeeren durch Extraktion, Aufkonzentrierung mittels XAD-7 und Trennung mittels HSCCC zu isolieren. Die Membranchromatographie eignet sich nicht nur als kostengünstigere und schnellere Alternative für die Isolierung von Anthocyanen als Standard bzw. Referenzmaterialien, sondern auch aufgrund des Verzichts auf gesundheitsschädliche Reagenzien als geeignetere Methode gegenüber der HSCCC, wenn es um die Isolierung von Anthocyanen für biologische Testungen geht.

Für die membranchromatographische Isolierung des Cyanidin-3-glucosids wurden 25 g des aus den frischen Brombeeren gewonnenen XAD-7-Extraktes verwendet. Der Extrakt wurde in 2 L Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v) gelöst und jeweils 1 L dieser Extraktlösung einer zweifachen

membranchromatographischen Trennung unterzogen. Wie Abb. 3.89 zeigt, gelangen während des gesamten ersten membranchromatographischen Durchlaufes maximal 6,66% der Ausgangskonzentration an Anthocyanen in das Permeat, das heißt, auch hier wird innerhalb des Beladungsvolumens von 1 L (entsprechend 12,5 g Extrakt) die dynamische Bindungskapazität des Adsorbers nicht überschritten. Nach Vereinigung von Permeat und Spülfraktion konnten nach einem zweiten membranchromatographischen Zyklus nur noch max. 0,4% der Ausgangskonzentration an Cyanidin-3-glucosid im Permeat nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass mind. 99,6% des Cyanidin-3-glucosids durch die zwei Zyklen vom Membranadsorber retardiert wurden.



* bezogen auf die Ausgangskonzentration



* bezogen auf die Ausgangskonzentration

Abb. 3.89: Anthocyanretention während der ersten (oben) und zweiten (unten) membranchromatographischen Trennung einer Brombeerextraktlösung der Konzentration 12,5 g/L, gelöst in Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v).

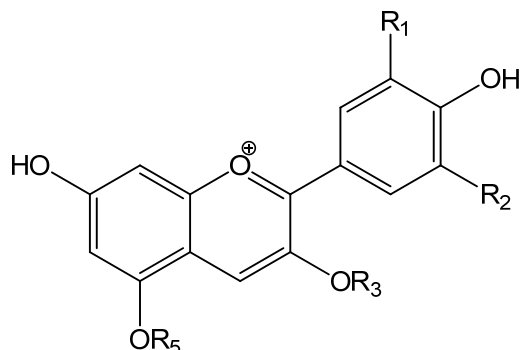
Nach Elution der Anthocyane und Entfernen des NaCl mittels Adsorption an Amberlite® XAD-7 wurden 5,65 g Cyanidin-3-glucosid mit einer chromatographischen Reinheit von 88% (520 u. 280 nm, HPLC-DAD) erhalten. Die übrigen 12% waren Begleit- bzw. Minoranthocyane, während die Copigmente vollständig durch die Membranchromatographie abgetrennt werden konnten, wie aus dem Vergleich der HPLC-DAD-Chromatogramme des Extraktes und der Fraktion der Anthocyane in Abb. 3.88 deutlich hervorgeht.

Durch präparative HPLC konnte das Cyanidin-3-glucosid anschließend von den Begleitanthocyanen getrennt und in einer Reinheit > 98% gewonnen werden, so dass es im Rahmen dieser Arbeit als Standard für die photometrische Bestimmung des Gesamtanthocyangehaltes bzw. zur Quantifizierung mittels HPLC zur Verfügung stand. Die hohe Reinheit wurde dabei durch HPLC-DAD-

ESI-MS, Vergleich mit einem kommerziellen Standard, NMR-Spektroskopie und durch die Bestimmung des molaren Adsorptionskoeffizienten ε (siehe Kapitel 5.5.4.2) sichergestellt. Dieser entsprach mit $\varepsilon = 26650$ nahezu dem in der Literatur (Lee et al., 2008) gefundenen Wert von $\varepsilon = 26900$. Rechnerisch entspricht auch das einer Reinheit von über 98%, so dass eine Verunreinigung des Standards ausgeschlossen werden konnte.

3.5.4.5 Isolierung von Anthocyan-Diglucosiden aus Granatapfel

Als ein weiteres Beispiel für die Anwendung der Membranchromatographie soll die Isolierung von Anthocyanen aus Granatapfel dienen. Der Granatapfel (*Punica granatum*) stammt ursprünglich aus West- bis Mittelasien und wird seit Jahrhunderten im gesamten Mittelmeerraum und Nahen Osten kultiviert. Sein Name ist auf das lateinische Wort *granatus* = körnig oder kernreich zurückzuführen, denn die apfelähnliche Frucht besitzt im Inneren etwa 400 kantige Samen, die von einem tiefrot bis blass gefärbten saftigen Samenmantel umgeben sind. Das Fruchtfleisch dieser essbaren Samen zeigt hohe Gehalte an bioaktiven Inhaltsstoffen wie Flavonoide, Anthocyane und Phenolcarbonsäuren (Tzulker et al., 2007; Alighourchi et al., 2008). Aus diesem Grund besitzt der Granatapfelsaft eine etwa dreimal höhere antioxidative Aktivität als Rotwein oder grüner Tee (Gil et al., 2000) und zeigt in vielen Studien anti-atherosklerotische und anti-inflammatorische Effekte (Aviram et al., 2000; Shukla et al., 2008; Rasheed et al., 2009). Einen großen Beitrag könnten die sechs im Granatapfel enthaltenen Anthocyane leisten. Dabei handelt es sich um die Aglykone Delphinidin, Cyanidin und Pelargonidin (siehe Abb. 3.90), die jeweils als 3-Glucoside sowie als 3,5-Diglucoside im Granatapfel vorliegen (Du et al., 1975).



	R ₁	R ₂	MW [g/mol]
Cyanidin (Cy)	OH	H	287
Delphinidin (Del)	OH	OH	303
Pelargonidin (Pel)	H	H	271

Abb. 3.90: Chemische Struktur der im Granatapfel vorkommenden Anthocyane. Die gezeigten Aglykone kommen jeweils als 3-Glucoside (R₃ = Glucose; R₅ = H) sowie als 3,5-Diglucoside (R₃ und R₅ = Glucose) im Granatapfel vor.

Im Folgenden soll die Isolierung der im Granatapfel enthaltenen Anthocyane zunächst durch HSCCC und präp. HPLC und anschließend zum Vergleich durch die Kombination aus Membranchromatographie und HSCCC gezeigt werden.

Zunächst wurde aus 330 g Granatapfel-Kernen (30 Granatäpfel) durch Extraktion des umgebenden Fruchtfleisches mit Methanol/Eisessig 19:1 8 (v/v) ein Rohextrakt hergestellt (siehe Kapitel 5.4.4). Aus diesem Rohextrakt wurden die phenolischen Verbindungen durch Adsorption an XAD-7 (siehe Kapitel 5.4.5) in Form eines XAD-7-Extraktes (8,7 g) erhalten. Die Anthocyane des XAD-7-Extraktes wurden mittels HPLC-DAD-ESI-MS identifiziert. Das HPLC-Chromatogramm des Extraktes und auch das Chromatogramm der anschließend durchgeführten Trennung mittels HSCCC, bei der Detektionswellenlänge von 520 nm, zeigt Abb. 3.91. Es konnten folgende Anthocyane identifiziert

werden, wobei die römischen Zahlen die HSCCC-Fractionen (FI-FVII) angeben, in denen die einzelnen Anthocyane angereichert werden konnten: Del-3,5-diglucosid (**1**) [II], Cy-3,5-diglucosid (**2**) [III], Del-3-glucosid (**3**) [V], Pel-3,5-diglucosid (**4**) [IV], Cy-3-glucosid (**5**) [VI], Pel-3-glucosid (**6**) [VII].

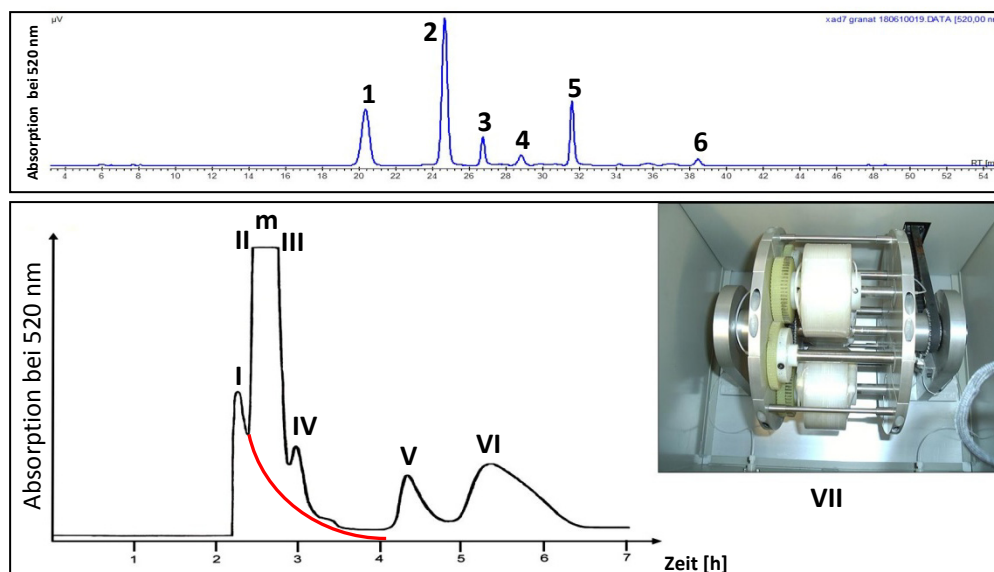


Abb. 3.91: HPLC-Chromatogramm und HSCCC-Chromatogramm der Trennung des XAD-7-Extraktes aus Granatapfel. Peak Nummerierung siehe Text, m = Mischfraktion.

Neben den Anthocyanen waren im Extrakt auch viele Copigmente nachweisbar, wie anhand der HPLC-DAD-Chromatogramme des Extraktes und der nach Membranchromatographie erhaltenen Copigmentfraktion in Abb. 3.92 gezeigt werden kann. Zielsetzung war jedoch die vollständige Isolierung der Anthocyanfraktion, deshalb wurden die Copigmente im Extrakt nicht näher untersucht. Zunächst wurde eine HSCCC-Trennung mit 1,5 g des Extraktes und dem Fließmittelsystem TBME/n-BuOH/MeCN/H₂O 1:3:1:5 (v/v/v/v) + 0,1% TFA durchgeführt. Nach dem Durchbruch der mobilen Phase eluieren mit dem Peak I zunächst die im Extrakt enthaltenen polymeren Bestandteile. Dann folgen in den weiteren Fraktionen die sechs im HPLC-Chromatogramm identifizierte Anthocyane in Fraktionsgrößen von 36 mg bis 145 mg und Reinheiten von 10% bis zu 51%. Bei den angegebenen Reinheiten der Fraktionen handelt es sich um chromatographische Reinheiten bei 280 nm, um sowohl die Anthocyane als auch Copigmente und polymere Verbindungen in den Fraktionen zu erfassen. Fraktion II enthielt Delphinidin-3,5-diglucosid mit einer Reinheit von 42,6%, Fraktion III Cyanidin-3,5-diglucosid mit einer Reinheit von 51,2%. Diese beiden Anthocyane konnten durch die HSCCC nicht vollständig getrennt werden. Es wurde noch eine Mischfraktion (m = 127 mg), in der beide Anthocyane angereichert werden konnten, erhalten. Die rote Linie im gezeigten HSCCC Chromatogramm ist fiktiv und soll den Verlauf der Polymerfraktion darstellen. Dieser Verlauf erklärt, warum die ersten Fraktionen und besonders Fraktion IV, die das Pelargonidin-3,5-diglucosid enthält, nur so geringe Reinheiten besitzen. Denn gerade das Pelargonidin-3,5-diglucosid ist im Extrakt in viel geringeren Konzentrationen als die beiden zuvor genannten Diglucoside enthalten, so dass die Verunreinigung durch die in die Fraktionen gelangten Polymere im Verhältnis viel größer ist. Hinzu kommt, dass diese Fraktion durch einige der polareren Copigmente, die mittels der HSCCC-Trennung nicht abgetrennt werden konnten, zusätzlich verunreinigt wurde. Dies bestätigen auch die in Abb. 3.94 gezeigten HPLC-Chromatogramme der erhaltenen Fraktionen. Zwar nimmt der Anteil an

koeluierenden Polymeren mit zunehmender Trennungsdauer ab, jedoch werden die Fraktionen zunehmend durch koeluierende Copigmente verunreinigt. Dies zeigt sich auch anhand der Fraktionen V, VI und besonders anhand der Coilfraktion. So konnten in diesen Fraktionen Delphinidin-3-glucosid, Cyanidin-3-glucosid und Pelargonidin-3-glucosid nur zu 24,7%, 46,7% und 10,4% angereichert werden, wie die Tab. 3.16 zeigt.

Tab. 3.16: Übersicht über die in den einzelnen HSCCC-Fraktionen angereicherten Diglucoside

Fraktion	I	II	m	III	IV	V	VI	Coil = VII
Name	Polymere	Del-3,5-diglc	Del-3,5-diglc Cy-3,5-diglc	Cy-3,5-diglc	Pel-3,5-diglc	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pel-3-glc
[mg]	172	127	127	145	79	59	77	36
Reinheit [280 nm]		42,6%		51,2%	23,5%	24,7%	46,7%	10,4%

Durch die abschließende Aufreinigung mittels präparativer HPLC konnten die Anthocyane in chromatographischen Reinheiten > 98% gewonnen werden, so dass durch ESI-MS-Spektren und NMR-Spektroskopie die Strukturen der Verbindungen bestätigt werden konnten.

Im Folgenden soll nun zum Vergleich die Isolierung der Anthocyane durch Kombination von Membranchromatographie und HSCCC gezeigt werden. Im vorhergehenden Abschnitt wurde deutlich, dass bei der Trennung von XAD-7-Extrakten mittels HSCCC die im Extrakt vorhandenen Polymere und auch die polareren Copigmente die erhaltenen Anthocyanfraktionen verunreinigen, weil sie aufgrund der Trenntechnik durch sehr ähnlichen Polaritäten nicht vollständig von den Anthocyanen abgetrennt werden können. Zwar besteht die Möglichkeit, die Copigmente durch Extraktion mit Ethylacetat (siehe Kapitel 5.4.7) aus dem Extrakt zu entfernen, jedoch ist diese Trennung unvollständig und gerade die polareren Copigmente, die die Trennungen mittels HSCCC am meisten stören, lassen sich dadurch nicht vollständig erfassen (vergl. Kapitel 3.2.1). Weiterhin besteht die Möglichkeit, die polymeren Verbindungen mittels einer Hexanfällung auszufällen (siehe Kapitel 5.4.8). Dies gelingt bei anthocyanhaltigen Proben aber auch nur bedingt. Es können nur die gegenüber den Anthocyanen deutlich polareren Polymere ausgefällt werden, nicht jedoch die Polymere, die für die Verunreinigung der Anthocyanfraktionen verantwortlich sind.

Die Membranchromatographie ist jedoch eine selektive Methode, die Anthocyane anhand ihrer Ladung und nicht wie bei der HSCCC aufgrund ihrer Verteilungskoeffizienten zu isolieren und stellt somit eine effektive neue Möglichkeit dar, die störenden Copigmente und polymeren Bestandteile vor der HSCCC-Trennung zu entfernen. Dazu wurden 7 g des XAD-7-Extraktes in 1 L Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) gelöst und durch zweifache Membranchromatographie gemäß Kapitel 5.4.3.2 getrennt. Es wurden 1,9 g der Anthocyanfraktion sowie 4,9 g der Copigmentfraktion erhalten. Eine Trennung des Rohextraktes funktionierte aufgrund der hohen Gehalte an Kalium⁺-Ionen nicht, da diese bevorzugt an der Membranoberfläche adsorbierten und zunächst durch die Herstellung des XAD-7 Extraktes entfernt werden mussten.

Die Abb. 3.92 zeigt die HPLC-DAD Chromatogramme des Extraktes und der erhaltenen Subfraktionen. Es wird deutlich, dass sich die Membranchromatographie ebenfalls zur Isolation von Anthocyan-Diglucosiden eignet. Alle im Extrakt enthaltenen Anthocyane wurden vollständig von den restlichen phenolischen, bei einer Wellenlänge um 280 nm adsorbierenden Extraktbestandteilen abgetrennt.

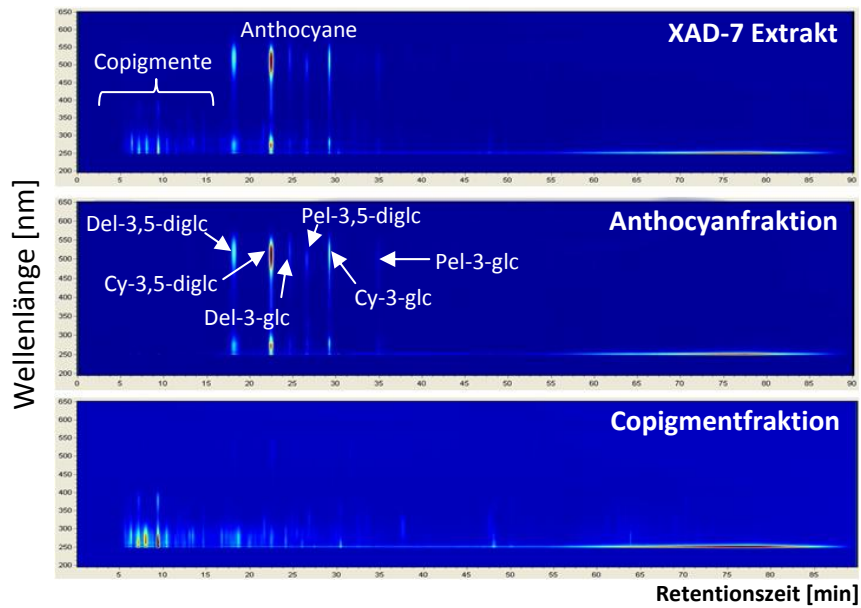


Abb. 3.92: HPLC-DAD-Chromatogramme des Granatapfelextraktes sowie der mittels Membranchromatographie aus dem Extrakt erhaltenen Subfraktionen.

Die aus der Membranchromatographie erhaltene Anthocyanfraktion wurde anschließend unter identischen Bedingungen wie der XAD-7-Extrakt einer HSCCC-Trennung unterzogen. Das Chromatogramm dieser Trennung zeigt die Abb. 3.93.

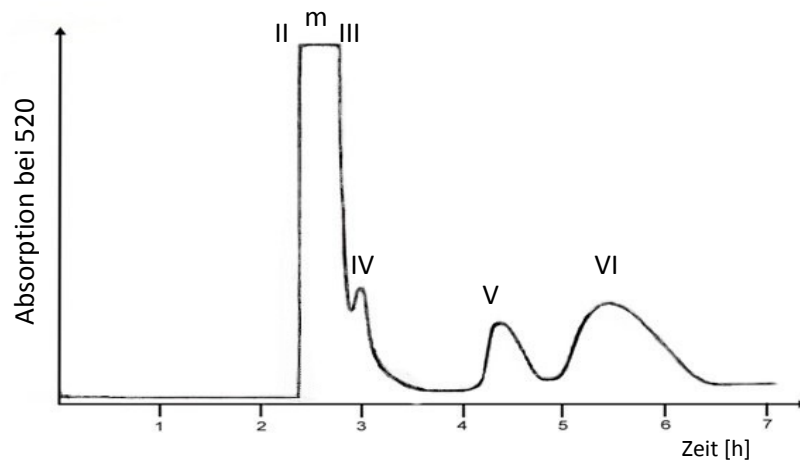


Abb. 3.93: HSCCC-Chromatogramm der Trennung der aus der Membranchromatographie erhaltenen Anthocyanfraktion aus Granatapfel, m = Mischfraktion.

Beim Vergleich des HSCCC-Chromatogrammes mit dem Chromatogramm der Trennung des XAD-7 Extraktes in Abb. 3.91 wird anhand des fehlenden Polymer-Peaks (Peak I) deutlich, dass jetzt keine polymeren Bestandteile die Anthocyanfraktion durch Koelution verunreinigen. Dies konnte auch durch die HPLC-DAD Analytik der erhaltenen Fraktionen bestätigt werden. Abb. 3.94 zeigt die HPLC-Chromatogramme des Extraktes und der Fraktionen II, III und IV aus beiden HSCCC-Trennungen zum Vergleich. Während im Extrakt bei 520 nm nur die Anthocyane detektiert werden, sind bei 280 nm deutlich die Peaks der Copigmente und auch ein Polymerhump im hinteren Teil des Chromatogrammes zu sehen.

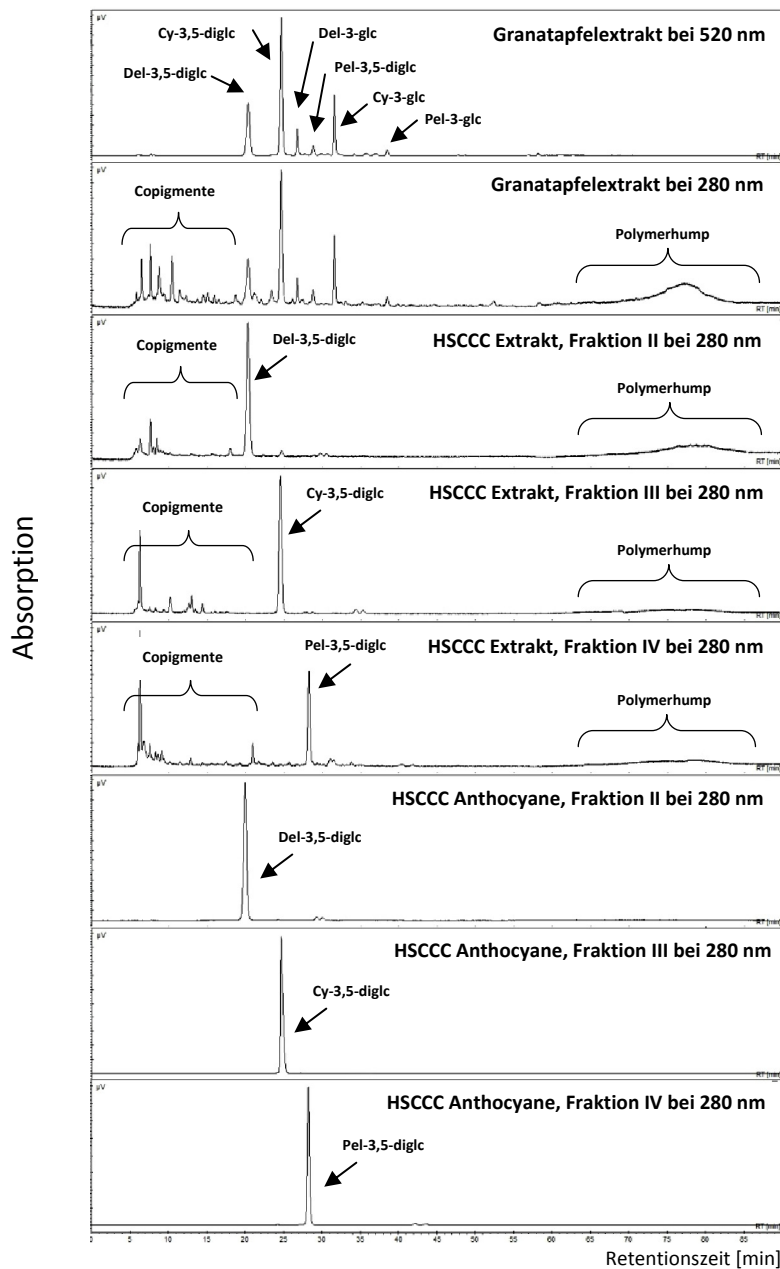


Abb. 3.94: HPLC-Chromatogramme des Granatapfelextraktes und ausgesuchter HSCCC-Fractionen aus der Trennung des Extraktes und der Trennung der mittels Membranchromatographie erhaltenen Anthocyanfraktion aus Granatapfelextrakt.

Auch die HPLC-Chromatogramme der HSCCC-Fractionen II, III, IV aus der Trennung des Extraktes zeigen neben den Anthocyanen zahlreiche Copigmente, sowie, anhand der leichten Erhebungen im hinteren Teil der Chromatogramme sichtbar, auch Anteile von polymeren Verbindungen. Die HSCCC-Fractionen II, III, IV aus der Trennung der mittels Membranchromatographie erhaltenen Anthocyanfraktionen zeigen dagegen keine Verunreinigungen durch Copigmente und polymere Extraktbestandteile. Es wurden alle Anthocyane in chromatographischen Reinheiten > 98% bei 280 nm erhalten. So kann gezeigt werden, dass die Membranchromatographie zur Abtrennung von Polymeren und Copigmenten vor einer HSCCC-Trennung zur Gewinnung von Standardsubstanzen durchaus sinnvoll und lohnenswert ist.

Studien zeigen den Zusammenhang zwischen der Farbigkeit von Säften mit dem einhergehenden Abbau der Anthocyane während der Lagerung (Hillebrand, 2004; Würth, 2007). Da durch die Isolierung Standards der Granatapfelanthocyane vorlagen, wurde der visuelle Schwellenwert nach Hofmann (siehe Kapitel 5.5.5.2) sowie die antioxidative Aktivität der einzelnen Anthocyane mittels TEAC-Assay bestimmt (siehe Kapitel 5.5.4.3). Außerdem wurden mit den isolierten Anthocyanstandards Kalibriergeraden erstellt und die Gehalte der Anthocyane im XAD-7-Extrakt sowie in einem kommerziell erhältlichen Granatapfelsaft ermittelt. So konnte deren Beitrag zur Gesamtfarbe und zur antioxidativen Aktivität des Extraktes sowie des Granatapfelsaftes ermittelt und verglichen werden. Die antioxidative Aktivität des Saftes betrug 20,24 mmol Trolox/L, die des Extraktes 3,69 mmol Trolox/g. Mittels der Anthocyangehalte und der entsprechenden antioxidativen Aktivitäten (siehe Tab. 3.17) wurde errechnet, dass die Anthocyane im Saft nur 1% und im Extrakt nur 13,2% zur antioxidativen Aktivität beitragen. Anders als bei der Heidelbeere dürften für den Hauptteil der antioxidativen Aktivität somit nichtfarbige phenolische Verbindungen sowie polymere Abbauprodukte verantwortlich sein. Dies bestätigten auch Gil et al. (2000). Sie zeigten, dass die sogenannten Punicalagine, die Ellagitannine des Granatapfels, den höchsten Beitrag zur antioxidativen Aktivität der Frucht leisten.

Tab. 3.17: Überblick über die Gehalte, die antioxidativen Aktivitäten, die Schwellenwerte und Farbbeiträge der Granatapfel-Anthocyane

	Cy-3-glc	Cy-3,5-diglc	Del-3-glc	Del-3,5-glc	Pel-3-glc	Pel-3,5-glc	Gesamt
Gehalt im Extrakt [%]	2,10	8,74	1,32	7,42	0,63	2,12	22,33
Gehalt im Saft [mg/L]	11,00	29,76	10,69	38,67	2,83	4,44	97,39
Antioxidative Aktivitäten [mmol/g]	3,7	2,39	3,26	1,45	2,74	1,65	
Schwellenwert bei pH 3,5 [mg/L]	0,33	1,60	0,33	1,33	0,67	3,33	
Farbbeitrag im Extrakt [%]	12,60	10,93	7,92	11,13	1,89	1,27	45,74
Farbbeitrag im Saft [%]	4,13	2,33	4,01	2,69	0,53	0,17	13,84

Der deutlich niedrigere Farbbeitrag der Anthocyane im Saft gegenüber dem Extrakt ist darauf zurückzuführen, dass bei der Saftgewinnung auch das nichtfarbige und polyphenolreiche, die Kerne umgebende Fruchtfleisch ausgepresst wird, während der Extrakt nur aus dem die Kerne umgebenden roten Samenmantel gewonnen wurde. Außerdem erfolgt im Saft während der Lagerung ein Abbau der monomeren Anthocyane zu polymeren Verbindungen, die aber dennoch einen Beitrag zur antioxidativen Aktivität leisten können (Quast, 2008). Aus diesen Gründen kommt es zu höheren Gehalten an Copigmenten und polymeren Verbindungen im Saft. Während der Farbbeitrag der Anthocyane im Extrakt insgesamt 45,74% beträgt, zeigten die monomeren Anthocyane im Saft, bei einem pH-Wert von 3,5, nur einen Farbbeitrag von 13,84%.

Durch diese Versuchsreihe konnte noch einmal deutlich gemacht werden, dass die Membranchromatographie ein praktisch unverzichtbares Mittel zur selektiven Isolation der Anthocyane darstellt. Sei es, um die Anthocyane in originärer Zusammensetzung unter Erhalt des Anthocyanprofils von Copigmenten und polymeren Verbindungen abzutrennen, sei es als praktischer Anreicherungs- und Aufreinigungsschritt zur Gewinnung von Anthocyanstandards. Die Membranchromatographie ist die einzige bisher bekannte Methode, um Anthocyane schnell und selektiv von anderen phenolischen Verbindungen abzutrennen.

3.6 Strategien zur Isolierung wertgebender Inhaltsstoffe aus Heidelbeertrester

Der bei der Saftgewinnung als Nebenprodukt anfallende Heidelbeertrester enthält noch eine ganze Reihe von wertgebenden Inhaltsstoffen. Diese sollen im Rahmen einer umfassenden Analytik zunächst erfasst sowie Isolierungsstrategien zur präparativen Gewinnung entwickelt werden. Das Extraktionsschema für die Isolierung von Inhaltsstoffen und Fraktionen aus einem Heidelbeertrester, der bei der Safterstellung der Firma Bayernwald anfiel, zeigt die Abb. 3.95.

Heidelbeertrester: Schalen, Samen, Stämmchen

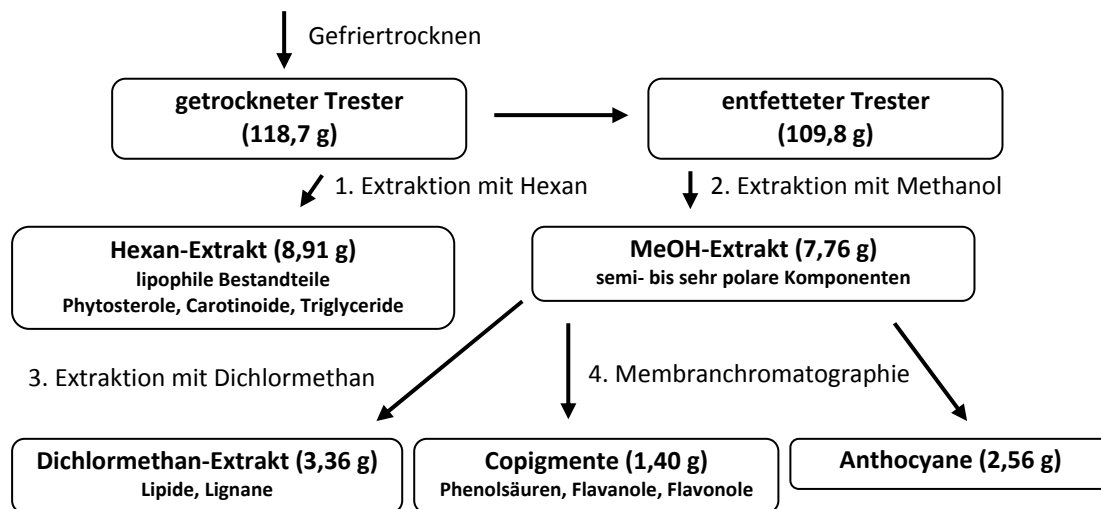


Abb. 3.95: Extraktionsschema zur Untersuchung und Isolierung von Inhaltsstoffen aus dem Heidelbeertrester

Zunächst wurden durch mehrfache Extraktionen mit Hexan die lipophilen Bestandteile wie Phytosterole, Carotinoide und Triglyceride aus dem Trester extrahiert. Der Gewichtsverlust des Tresters betrug dadurch 7,50%. Es wurden aus 118,7g Trester 8,91 g des Hexanextraktes erhalten. Anschließend erfolgte eine mehrfache Extraktion des entfetteten Tresters mit Methanol, um die semi- bis sehr polaren Verbindungen zu erfassen. Aus diesem Methanol-Extrakt wurden durch Extraktion mit Dichlormethan die semi-polaren Komponenten wie Lipide und Lignane erhalten. Abschließend wurden durch eine membranchromatographische Trennung die Copigmente wie Phenolsäuren, Flavanole und Flavonole von den Anthocyanen im Rückstand abgetrennt. Die Ausbeuten der einzelnen Fraktionen zeigt ebenfalls die Abb. 3.95.

3.6.1 Fraktionierung und Charakterisierung der lipophilen Inhaltsstoffe

Die Charakterisierung der im Hexanextrakt enthaltenen lipophilen Inhaltsstoffe erfolgte mittels HPLC-APCI-MS (APCI = Atmospheric pressure chemical ionisation), da es sich bei den Analytmolekülen um Verbindungen handelt, die überwiegend aus Kohlenwasserstoffatomen bestehen und sich mittels ESI-MS nur sehr schlecht ionisieren lassen. Mit der APCI stand dagegen eine schonende Methode zur Verfügung, die es ermöglicht, auch Verbindungen mit sehr wenig oder keinen Heteroatomen zu ionisieren. Allerdings werden auf diese Weise nur positiv geladene Quasimolekülonen erhalten und

Fragmentierungen sind eher selten. So eignet sich diese Methode nur als Screening auf eventuell vorhandene Inhaltsstoffe durch Ermittlung des Molekulargewichts. Identifizierungen über die Fragmentierung wie bei der ESI-MS-Analytik sind dagegen kaum möglich.

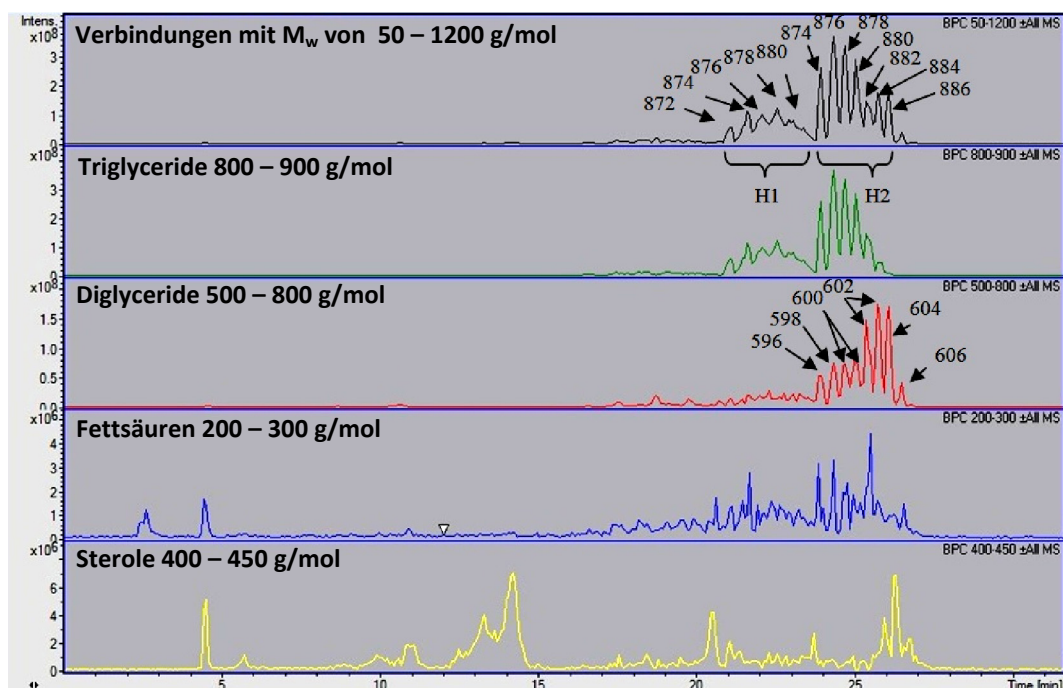


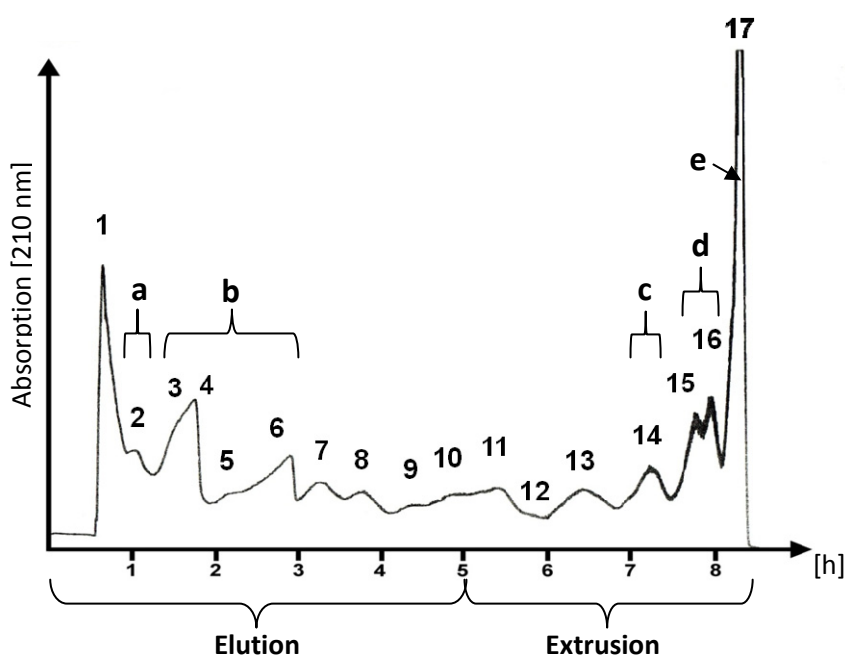
Abb. 3.96: Base-Peak-Chromatogramme (BPC) der HPLC-APCI-MS-Messung des Hexanextraktes für unterschiedliche Molekulargewichtsbereiche.

Abb. 3.96 zeigt die Base-Peak-Chromatogramme (BPC) der HPLC-APCI-MS-Messung des Hexanextraktes für unterschiedliche Molekulargewichtsbereiche. Das Chromatogramm in schwarz zeigt Quasimolekülonen von Verbindungen, deren Molekulargewichte im Bereich von 50-1200 g/mol liegen. Betrachtet man dieses Spektrum, so sind im Wesentlichen zwei Bereiche erkennbar. Der erste Bereich (H1) erstreckt sich von 21,0-23,4 min, der zweite Bereich (H2) von 23,9 bis 26,0 min. In H1 lassen sich Quasimolekülonen detektieren, deren Masse zu Ladungsverhältnis im Bereich von m/z 872 bis m/z 882 liegt. H2 enthält Quasimolekülonen mit einem Masse zu Ladungsverhältnis von m/z 874 bis m/z 886. Hierbei handelt es sich um Triglyceride, aufgebaut aus ungesättigten Fettsäuren wie z. B. Linol- oder Ölsäure, deren Molekulargewichtsbereich zwischen 800-900 g/mol liegt. Im HPLC-Lauf trennen sie sich nach ihrem Sättigungscharakter auf. Das BPC in grün zeigt ausschließlich den Molekulargewichtsbereich von 800 bis 900 g/mol. Darunter in rot dargestellt, befindet sich das BPC für Verbindungen, deren Molekulargewichtsbereich im Bereich der zwischen 500 und 800 g/mol liegt. Die BPC der Molekulargewichtsbereiche freier Fettsäuren (200 bis 300 g/mol, blau) und Sterole (400 bis 450 g/mol, gelb) sind darunter dargestellt. Es wird deutlich, dass die Triglyceride mit Intensitäten von 3×10^8 und die Diglyceride, mit Intensitäten von $1,5 \times 10^8$, die Hauptverbindungen des Hexanextraktes darstellen, während die freien Fettsäuren und Sterole, mit Intensitäten von 4×10^6 bzw. 6×10^6 nur als Minorkomponenten, mit um zwei Zehnerpotenzen niedrigeren Gehalten vorliegen. Tab. 3.18 listet zu den detektierten Quasimolekülonen der Triglyceride mögliche Strukturvorschläge auf.

Tab. 3.18: Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) möglicher Fettsäurekombinationen der im Heidelbeertrester enthaltenen Triglyceride

m/z	t_R [min] Bereich H1	t_R [min] Bereich H2	mögliche Fettsäuren im Triglycerid	Molekulargewichte Fettsäuren
872	21,0		3 x Linolensäure	3 x 278
874	21,6	23,9	2 x Linolensäure 1 x Linolsäure	2 x 278 1 x 280
876	22,0	24,3	1 x Linolensäure 2 x Linolsäure	1 x 278 2 x 280
878	22,5	24,6	3 x Linolsäure	3 x 280
880	22,9	24,9	2 x Linolsäure 1 x Ölsäure	2 x 280 1 x 282
882	23,4	25,3	1 x Linolsäure 2 x Ölsäure	1 x 280 2 x 282
884		25,6	3 x Ölsäure	3 x 282
886		26	2 x Ölsäure 1 x Stearinsäure	2 x 282 1 x 284

Um das sehr komplexe Spektrum an Verbindungen im Hexanextrakt genauer untersuchen zu können, wurden die lipophilen Inhaltsstoffe des Hexanextraktes mittels HSCCC im Modus „Head-to-Tail“ fraktioniert. Abb. 3.97 zeigt das erhaltene HSCCC-Chromatogramm der Trennung von 3 g des Hexanextraktes bei der Detektionswellenlänge von 210 nm.

**Abb. 3.97: HSCCC-Chromatogramm der Trennung von 3 g des Hexanextraktes aus Heidelbeertrester mit dem Fließmittelsystem: Hexan/Acetonitril 1:1 (v/v).**

Als Fließmittelsystem wurde Hexan/Acetonitril im Verhältnis 1:1 (v/v) verwendet. Die Flussrate betrug 3 mL/min und die Rotationsgeschwindigkeit des Coils 900 U/min. Mit dem Durchbruch der mobilen Phase (Acetonitril) nach 30 min, eluierten zunächst die polareren Bestandteile des Extraktes. Nach 5 h wurde die Trennung im Extrusions-Modus fortgeführt, um auch die lipophileren Verbindungen fraktioniert zu erhalten. Die insgesamt 17 Fraktionen wurden nach Einengen am

Rotationsverdampfer mittels Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel untersucht. Als DC-Laufmittel wurde Dichlormethan/Aceton im Verhältnis 19:1 (v/v), und für die Auftrennung der unpolaren Komponenten Dichlormethan/Hexan im Verhältnis 9:1 (v/v) verwendet. Detektiert wurde mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz nach Stahl (1967). Aus der Abbildung der erhaltenen Dünnschichtchromatogramme (Abb. 3.98) geht deutlich hervor, dass die einzelnen Fraktionen z.T. noch sehr komplex zusammengesetzt waren.

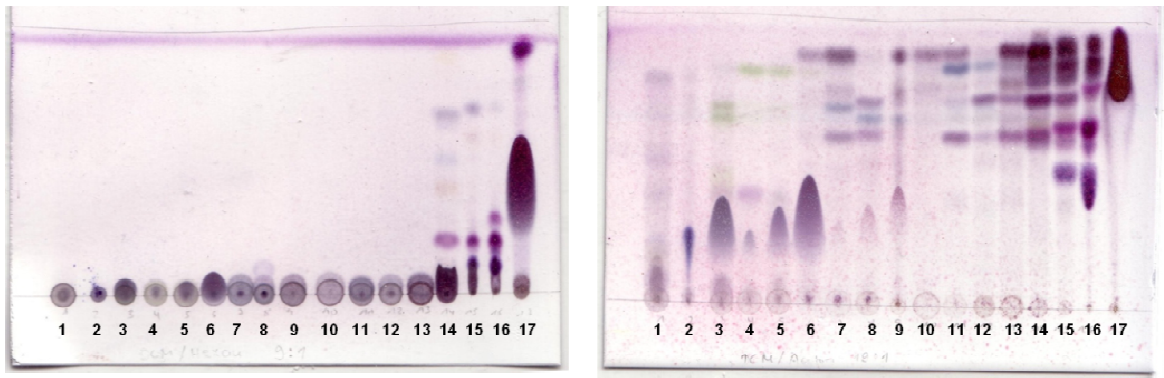


Abb. 3.98: Analyse der HSCCC-Fractionen des Hexanextraktes mittels Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel. Laufmittel: Dichlormethan/Hexan 9:1 (v/v) links und Dichlormethan/Aceton 19:1 (v/v) rechts. Detektion mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz nach Stahl (1967).

Anhand der Auswaagen der Fraktionen in Tab. 3.19 wird ersichtlich, dass es sich bei allen Verbindungen in den Fraktionen 1 bis 16 bestenfalls um Minorkomponenten handelt. Die Fraktion 17 mit einer Auswaage von 1750 mg enthält dagegen die Triglyceride als Hauptbestandteil des Extraktes.

Tab. 3.19: Auswaagen der HSCCC-Fractionen des Hexanextraktes aus Heidelbeertrester

Fraktion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
[mg]	51	49	63	40	37	73	44	45	47	44	50	42	66	73	76	121	1750

Nummerierung analog Abb. 3.97 und Abb. 3.98

Um dies zu bestätigen, wurde ein Screening der einzelnen Fraktionen mittels HPLC-APCI-MS durchgeführt. Nicht in allen Fraktionen konnten die darin enthaltenen Verbindungen ionisiert und detektiert werden, jedoch ließen sich in einigen Fraktionen Quasimolekülonen ermitteln, die Massen bekannter Phytosterole zeigten. In Fraktion 2 war ein Quasimolekülion mit m/z 429 nachzuweisen. Dabei könnte es sich z. B. um 6 β -Hydroxy-stigmast-4-en-3-on oder um 3 β -Hydroxystigmast-5-en-7-on mit Molekulargewichten von 428 g/mol handeln. In Fraktion 3 und 4 waren Quasimolekülionen mit m/z 417 und 411 detektierbar, die im ersten Fall auf β - oder γ -Tocopherol mit Molekulargewichten von je 416 g/mol und im zweiten Fall auf β - oder γ -Tocotrienol mit Molekulargewichten von 410 g/mol hindeuten. In Fraktion 7 wurde ein Quasimolekülion mit m/z 872 detektiert, wobei es sich hier vermutlich um das Chlorophyll-Abbauprodukt Phaeophytin mit einer molaren Masse von 871 g/mol handelt. Das Quasimolekülion mit m/z 577 in Fraktion 15 könnte von Sitosterol- β -D-glucosid stammen. In Fraktion 17 ließen sich dagegen die Triglyceride nachweisen. Aufgrund der gefundenen Quasimolekülion und Molekulargewichte ließen sich jedoch anhand der APCI-Messungen nur Vermutungen aufstellen, eine Identifizierung und Quantifizierung ist nur über die Isolierung möglich.

Um die Hauptkomponenten aus dem Hexanextrakt zu isolieren, wurde eine zweite HSCCC-Trennung unter identischen Bedingungen wie die in Abb. 3.97 gezeigte Trennung des Hexanextraktes durchgeführt. Zuvor wurde jedoch eine zweite Charge Heidelbeertrester extrahiert. Auf diese Weise sollte gleichzeitig die Reproduzierbarkeit der Methode sowie die Unabhängigkeit vom Probenmaterial sichergestellt werden. Das erhaltene Chromatogramm konnte beides bestätigen und war nahezu identisch mit dem HSCCC-Chromatogramm der ersten Trennung in Abb. 3.97. Für eine bessere Vorfraktionierung wurden alle durch den Fraktionssammler während der HSCCC-Trennung aufgefangenen Fraktionen mittels des gefundenen DC-Systems getüpfelt und anschließend vorfraktioniert. Abb. 3.99 zeigt das Dünnschichtchromatogramm der 35 resultierenden Fraktionen getrennt mit dem Laufmittel Dichlormethan/Hexan im Verhältnis 9:1 (v/v) auf Kieselgel. Detektiert wurde mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz nach Stahl (1967).

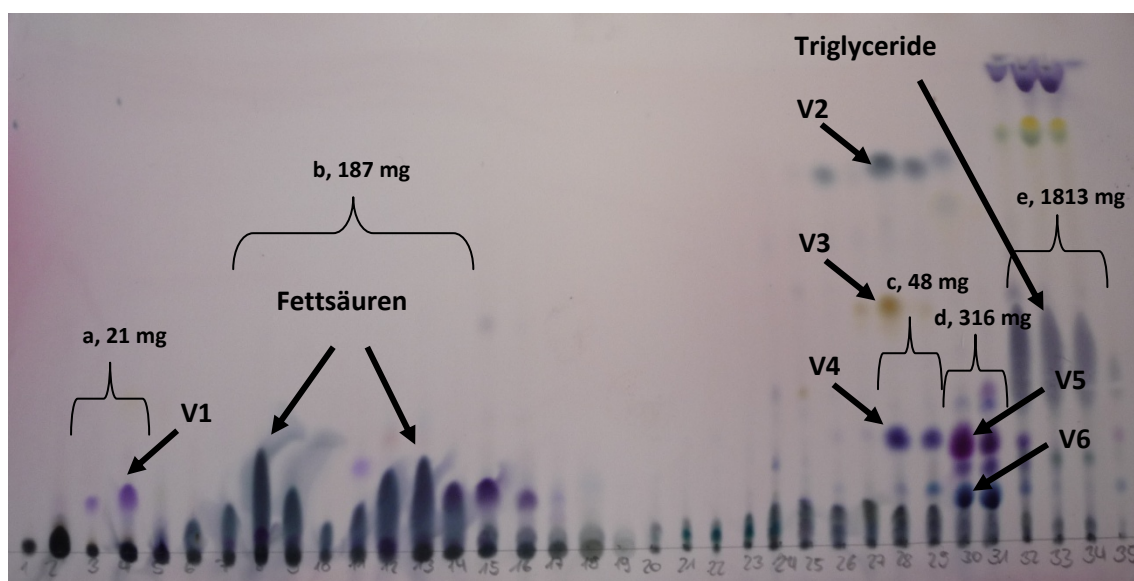


Abb. 3.99: Dünnschichtchromatogramm der 35 erhaltenen HSCCC-Fractionen aus dem Hexanextrakt des Heidelbeertresters. Laufmittel: Dichlormethan/Hexan 9:1 (v/v) auf Kieselgel, Detektion mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz nach Stahl (1967). Zuordnung der nummerierten Spots anhand der Tab. 3.20.

Fünf Fraktionen a bis e (vergl. Abb. 3.97 und Abb. 3.99) konnten im Anschluss zusammengefasst werden. Sie lieferten Auswaagen, die eine Isolierung von insgesamt sechs Hauptverbindungen unter den Minorkomponenten des Hexanextraktes mittels Säulenchromatographie anhand einer kleinen Kieselgelsäule ($D = 1\text{ cm}$, $L = 25\text{ cm}$) erlaubten. Aus der 21 mg umfassenden Fraktion a konnten mit dem Fließmittelsystem Dichlormethan/Hexan im Verhältnis 9:1 (v/v) 5 mg Oleanolsäure (V1) isoliert werden. Die 187 mg umfassende Fraktion b beinhaltete hauptsächlich freie Fettsäuren. Dies wurde durch die APCI-MS-Messungen dieser Fraktion bestätigt. Aus der 48 mg umfassenden Fraktion c konnten insgesamt drei Verbindungen mit dem Fließmittelsystem Dichlormethan/Hexan im Verhältnis 1:1 (v/v) isoliert werden: die Verbindungen α -Linolensäureethylester (V2) und β -Tocopherol (V3) jeweils in einer Ausbeute von 3 mg, sowie Phytol (V4) in einer Ausbeute von 7 mg. Aus 50 mg der 316 mg umfassenden Fraktion d konnten 20 mg β -Sitosterol (V5) und 10 mg β -Amyrin (V6) mit dem Fließmittelsystem Dichlormethan/Hexan im Verhältnis 9:1 (v/v) isoliert werden. Bezogen auf die gesamte Auswaage dieser Fraktion entspricht dies umgerechnet einer Menge von 126 mg Sitosterol und 63 mg β -Amyrin. Hauptbestandteile des Hexanextraktes waren jedoch die

bereits mittels APCI-MS identifizierten Triglyceride. Sie wurden mit der Fraktion e und einer Ausbeute von 1813 mg erhalten.

Tab. 3.20: Übersicht über die mittels HSCCC fraktionierten, mittels DC detektierten, mittels Säulenchromatographie an Kieselgel isolierten und mittels EI-MS identifizierten Verbindungen aus dem Hexanextrakt des Heidelbeertresters

Nr. + (Fraktion)	Verbindung	Molekül-Ion EI-MS [m/z]*	Formel	Masse [g/mol]	R_f -Wert**	DC-Spot ***	Auswaage [mg]
V1 (a)	Oleanolsäure	456	$C_{30}H_{48}O_3$	456,71	0,12	violett	5 mg
V2 (c)	α -Linolensäure-ethylester	306	$C_{20}H_{34}O_2$	306,48	0,77	graugrün	3
V3 (c)	β -Tocopherol	416	$C_{28}H_{48}O_2$	416,68	0,49	gelbbraun	3
V4 (c)	Phytol	296	$C_{20}H_{40}O$	296,54	0,23	blau	7
V5 (d)	β -Sitosterol	414	$C_{29}H_{50}O$	414,69	0,20	blauviolett	20 (126)
V6 (d)	β -Amyrin	426	$C_{30}H_{50}O$	426,72	0,08	blauviolett	10 (63)

*EI-MS Spektren der Verbindungen, siehe Anhang Kapitel 7.1. **DC-System: Kieselgel 60 (F254), Laufmittel: Dichlormethan/Hexan 9:1 (v/v). *** Detektion mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz nach Stahl (1967).

Die Identifizierung aller isolierten Verbindungen erfolgte mittels EI-MS (Ionisierungsenergie = 70eV, Einlaßsystem = Schubstange, Ionenquelltemperatur ca. 130° C) mit Anbindung an die NIST Standard Reference Database. Die erhaltenen Spektren befinden sich im Anhang in Kapitel 7.1. Die Verbindung 1 wurde bei der dünnschichtchromatographischen Bestimmung unter Verwendung des Anisaldehyd-Schwefelsäurereagenz als ein für Steroide typischer violetter Spot detektiert. Im EI-MS-Spektrum zeigte sie ein Molekülion m/z 456, zu dem die Molekularformel $C_{30}H_{48}O_3$ passte.

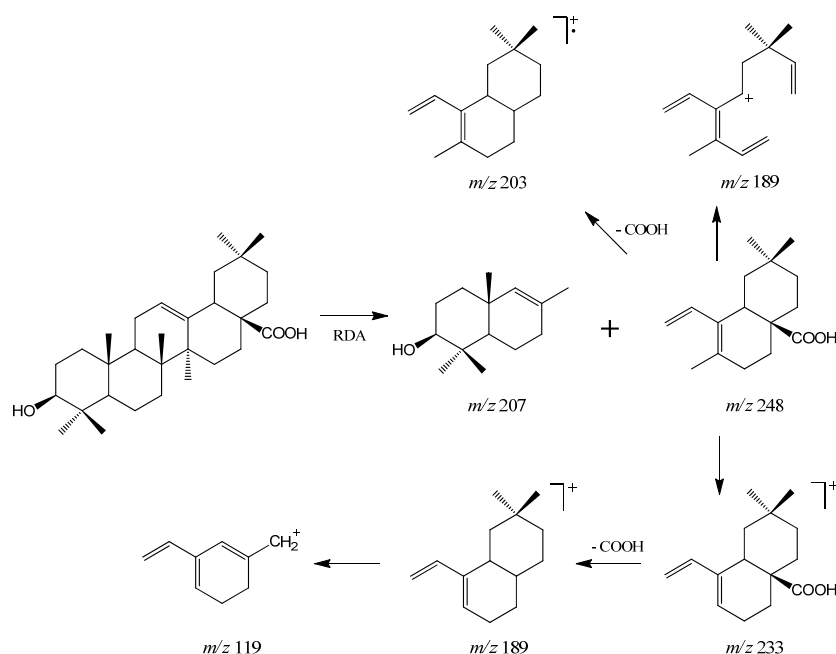


Abb. 3.100: EI-MS-Fragmentierungsmechanismus der isolierten Oleanolsäure nach Ayatollahi et al. (2011).

Intensive Peaks konnten bei m/z 248, 207 und 203 detektiert werden, weitere Fragmente bei 438, 410, 392, 233, 189, 175, 133, 119 und 69. In Übereinstimmung mit den in der Literatur gefundenen Daten (Ayatollahi et al., 2011) handelt es sich bei dieser Verbindung um Oleanolsäure. Die Abb. 3.100

zeigt den in dieser Literaturstelle vorgeschlagenen Fragmentierungsmechanismus. Oleanolsäure ist bereits aus weiteren Arten der Gattung *Vaccinium* bekannt (Szakiel und Mroczek, 2007) und wurde bereits in Stielen und Stämmchen von Wildheidelbeeren (*Vaccinium myrtillus*) nachgewiesen (Hybelbauerová et al., 2009). Verbindung 2 zeigte ein Molekülion m/z 306 und die Fragmente 261, 250, 191, 173, 163, 149, 135, 121, sowie intensivste Peaks bei m/z 108, 95, 79, 67, 55, 41. Über die NIST Standard Reference Database konnte diese Verbindung als α -Linolensäureethylester identifiziert werden. Bei der Verbindung 3 handelt es sich um β -Tocopherol mit einem Molekülion m/z 416 und intensive Fragmente bei m/z 191, 151, 55, 43. Die Verbindung 4 war ein bei Raumtemperatur gelbliches Öl. Über das Massenspektrum konnte sie als Phytol identifiziert werden. Dieser acyclische Diterpen-Alkohol ist normalerweise in veresterter Form ein Bestandteil des Chlorophylls. Im Massenspektrum zeigt Phytol ein Molekülion bei m/z 296 und Fragmente bei m/z 278, 123, 111, 95, 81, 71, 57, 43. Die Verbindungen 5 und 6 zeigten auf der DC-Platte, durch die Detektion mit Anisaldehyd-Schwefelsäurereagenz, die für Steroide typisch blauviolette Färbung. Anhand des Massenspektrums konnte V5 als β -Sitosterol, ein ubiquitäres Pflanzensterol, identifiziert werden. Aufgrund der Fraktionsgröße und der daraus resultierenden Möglichkeit, eine Menge von 126 mg zu isolieren, zeigte β -Sitosterol, gleich nach den Triglyceriden, den zweithöchsten Gehalt im Hexanextrakt. Von β -Sitosterol ist ein Vorkommen in Heidelbeeren bekannt, aus denen es ebenfalls schon isoliert werden konnte (Yang et al., 2003; Ono et al., 2004). Im EI-MS-Spektrum zeigt β -Sitosterol ein Molekülion von m/z 414 und weitere Fragmente bei m/z 396, 381, 329, 303, 273, 255, 231, 213, 161, 159, 145, 133, 119, 107, 105, 95, 93, 91, 81, 79, 69 sowie besonders intensive Peaks bei m/z 55 und 43. Bei V6 handelte es sich um einen pentacyclischen Triterpenalkohol, welcher ein Molekülion von m/z 426 und das intensivste Fragment bei m/z 218 zeigte.

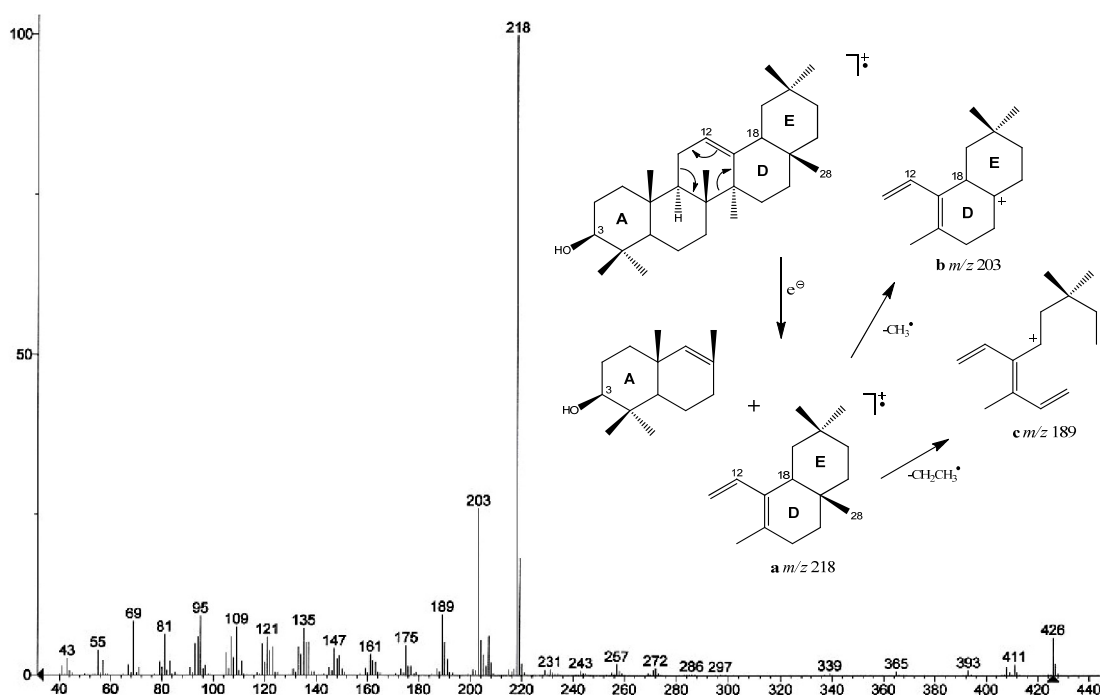


Abb. 3.101: EI-MS-Spektrum von β -Amyrin und der nach Klaubert (1998) postulierte Fragmentierungsmechanismus.

Weitere Fragmente konnten bei 203, 189, 175, 161, 147, 135, 121, 109, 95, 81, 69, 55 detektiert werden. Abb. 3.101 zeigt das erhaltene EI-MS-Spektrum sowie den nach Klaubert (1998)

vorgeschlagenen Fragmentierungsmechanismus. Es handelt sich um die Verbindung β -Amyrin, die schon 2004 aus *Vaccinium Ashei* (Ono et al., 2004) isoliert werden konnte.

Somit ist es gelungen, eine HSCCC-Methode zu entwickeln, um die Hexanfraktion der lipophilen Inhaltsstoffe aus dem Heidelbeertrester reproduzierbar zu trennen. Die Analytik mittels APCI-MS zeigte, dass im Hexanextrakt überwiegend Triglyceride enthalten sind, während freie Fettsäuren und Sterole nur die Rolle von Minorkomponenten einnehmen. Unter den lipophilen Minorkomponenten ist es gelungen, einige mittels Säulenchromatographie an Kieselgel aus den HSCCC-Fractionen zu isolieren und durch EI-MS zu identifizieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass das β -Sitosterol nach den Triglyceriden die Hauptkomponente unter den lipophilen Inhaltsstoffen des Heidelbeertrester ist. Für alle isolierten Verbindungen gibt es verschiedenste interessante Bioaktivitäten in der Literatur zu finden, so dass auch die Fraktion der lipophilen Bestandteile der Wildheidelbeere sehr interessant erscheint.

3.6.2 Fraktionierung des Dichlormethanextraktes

Von der Dichlormethanfraktion aus dem Heidelbeertrester wurden 3 g mittels HSCCC, unter identischen Parametern wie die Hexanfraktion im vorhergehenden Kapitel, mittels des Fließmittelsystems Hexan/Acetonitril im Verhältnis 1:1 (v/v) getrennt. Die Flussrate betrug 3 mL/min und die Rotationsgeschwindigkeit des Coils 900 U/min. Die Einteilung der Fraktionen erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (Abb. 3.102), da die meisten Komponenten keine UV/VIS-Aktivität zeigten und eine Fraktionierung anhand des HSCCC Chromatogrammes nicht sinnvoll war.

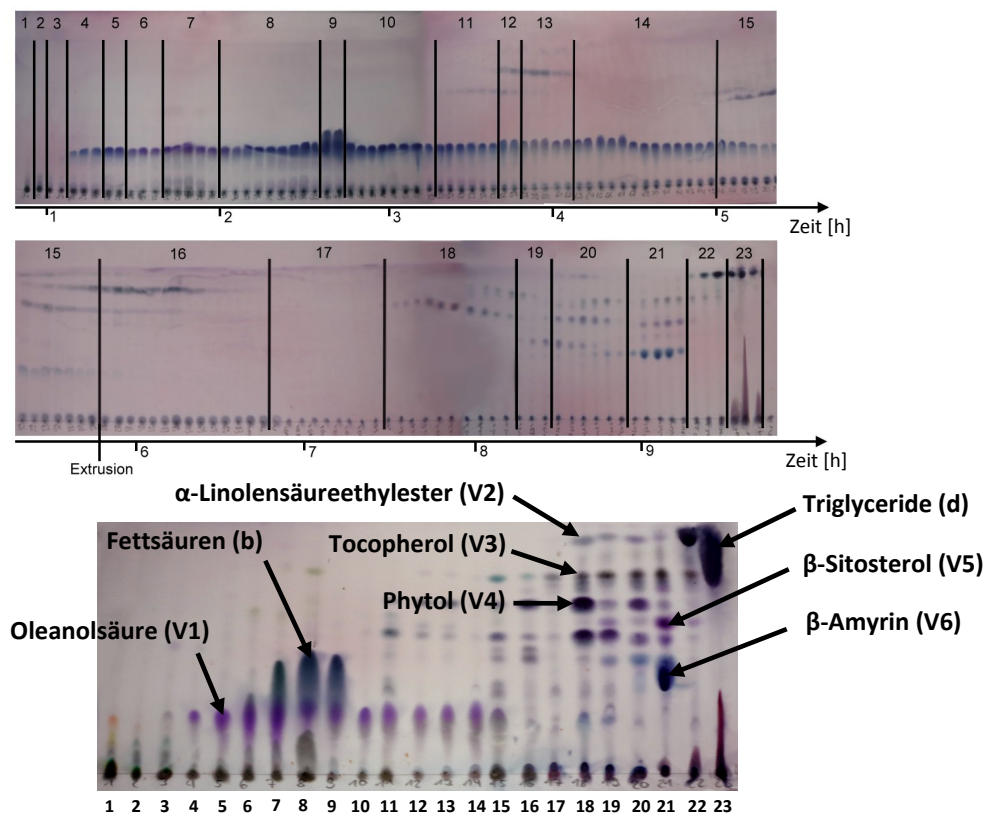


Abb. 3.102: Fraktionierung der HSCCC-Trennung des Dichlormethanextraktes anhand der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel. Laufmittel: Dichlormethan/Aceton 19:1 (v/v), Detektion mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz nach Stahl (1967).

Für die Dünnschichtchromatographie wurde Kieselgel mit dem Laufmittel Dichlormethan/Aceton im Verhältnis 19:1 (v/v) verwendet. Detektiert wurde mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz nach Stahl (1967). Die Dünnschichtchromatographie der erhaltenen Fraktionen zeigte große Übereinstimmung mit dem Inhaltsstoffspektrum der HSCCC-Fractionen des Hexanextraktes (vergl. Kapitel 3.6.1, Abb. 3.99 und Tab. 3.20). Während jedoch im Hexanextrakt die lipophileren Fraktionen mit den Triglyceriden quantitativ überwogen, konnten bei der Extraktion des Tresters mit Dichlormethan die etwas polareren Inhaltsstoffe, vor allem die freien Fettsäuren, besser angereichert werden. Das wird anhand der Tab. 3.21 deutlich, die einen Überblick über die erhaltenen Fraktionsgrößen der HSCCC-Trennung gibt.

Tab. 3.21: Auswaagen der HSCCC-Fractionen der Trennung des Dichlormethanextraktes

Fraktion	1	2	3	4	5	6	7	8
[mg]	48	39	60	75	48	72	123	165
Zuordnung*					V1		b	b
Fraktion	9	10	11	12	13	14	15	16
[mg]	42	105	60	27	60	120	75	57
Zuordnung*	b							
Fraktion	17	18	19	20	21	22	23	
[mg]	15	54	12	45	75	96	1404	
Zuordnung*		V2,V3,V4			V5,V6		d	

*Zuordnung der Verbindungen erfolgt analog den DC-Spektren in den Abb. 3.99 und Abb. 3.102 sowie der Tab. 3.20.

Neben dem mittels DC gezeigten, nahezu identischen Inhaltsstoffspektrum der Fraktionen, erfolgt lediglich eine Verschiebung der Fraktionsgrößen zu größeren Fraktionen im vorderen Bereich der Trennung. So wurden bei dieser Trennung etwas mehr freie Fettsäuren (b) in den Fraktionen 7, 8 und 9 angereichert als bei der Trennung des Hexanextraktes (vergl. Abb. 3.99). Dafür wurden jedoch weniger β -Sitosterol (V5), weniger β -Amyrin (V6) und auch weniger Triglyceride (d) mit den letzten Fraktionen erhalten.

3.6.2.1 Membranchromatographische Fraktionierung des methanolischen Rückstandes

Nach dem Abtrennen der Dichlormethanfraktion wurde der verbleibende methanolische Extrakt aus dem Heidelbeertrester mittels HPLC-DAD-ESI-MS analysiert. Es wurde neben den Copigmenten ein hoher Anthocyangehalt von 40,8% festgestellt. Um die Anthocyane von den Copigmenten abzutrennen, wurde die 4,4 g umfassende Fraktion einer membranchromatographischen Trennung nach Kapitel 5.4.3.2 unterzogen. Insgesamt konnten durch Lösen der Probe in 1 L Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) und zweifache Membranchromatographie 2,56 g einer copigmentfreien Anthocyanfraktion gewonnen werden. Diese zeigte, quantifiziert als Cyanidin-3-glc-Äquivalente, einen Gesamtanthocyangehalt von 72%, wobei das Anthocyanprofil dem der Wildheidelbeere entsprach. Auf die eingesetzte Trestermenge konnte somit eine Ausbeute von 2,16% an Anthocyanen erzielt werden. Aus der Permeatfraktion wurde die Copigmentfraktion (1,4 g) gewonnen und in Anlehnung an die in Kapitel 3.4.1 gezeigte HSCCC-Methode konnten alle auch im Heidelbeerextrakt identifizierten und in der Tab. 3.6 gezeigten Copigmente fraktioniert und identifiziert werden.

Somit zeigte sich, dass aus dem Heidelbeertrester, neben den gefundenen lipophilen Bestandteilen, darunter vor allem Triglyceride und einige bioaktive Minorkomponenten, z. B. das β -Amyrin oder das β -Sitosterol, noch ein beträchtlicher Anteil an phenolischen wertgebenden Komponenten enthalten ist. Besonders aus den das Fruchtfleisch umgebenden Schalen der Wildheidelbeere ließ sich noch ein beträchtlicher Anteil an Anthocyanen extrahieren. Diese wurden nach methanolischer Extraktion des Tresters und Abtrennung der lipophilen und semi-polaren Komponenten durch Membranchromatographie in hoher Reinheit erhalten. Die Ausbeute der mittels Extraktion aus dem Trester gewonnenen Inhaltsstoffe lässt sich sogar durch einen erhöhten Zellaufschluss mittels Ultraschall und Hochspannungsimpulsen noch beträchtlich steigern, wie im Rahmen des Projektes „Prozessinduzierte Ausbeutesteigerung von wertgebenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffen aus Blaubeeren und Vergleich ihrer Stabilität in Multikapselsystemen gegenüber konventionellen Produkten“ gezeigt werden konnte (FEI). So dürfte der Trester vor allem zur Gewinnung von Anthocyanen als wertgebende Komponenten für die Industrie von Nutzen sein.

4 Zusammenfassung

Durch die Entwicklung einer HPLC-Methode zur Charakterisierung und Quantifizierung von Heidelbeerpolyphenolen ist es gelungen, die Grundlage für die Erfassung der prozessinduzierten Ausbeutesteigerung von mit Hochspannungsimpulsen, Hochdruck und Ultraschall behandelten Heidelbeeren und Heidelbeertrestern zu schaffen. Mit der Methode wurde außerdem die Analytik von frischen Heidelbeerproben, Heidelbeerprodukten und verkapselten Heidelbeerinhaltsstoffen realisiert und ein von den einzelnen Teilprojekten im Rahmen des DFG/AiF-Clusterprojektes „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen,, (FEI) zu Verkapselungszwecken eingesetzter Heidelbeerextrakt vollständig charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die getrockneten Inhaltsstoffe der Heidelbeere, im Gegensatz zu Heidelbeerprodukten in wässriger Matrix, hinsichtlich einer Veränderung im Polyphenolprofil weitgehend stabil sind. Der Heidelbeerextrakt zeigte sogar während einer zweijährigen Lagerperiode, sowohl bei einer Kühlagerung (-18°C) als auch bei Raumtemperatur (25°C), unter Feuchtigkeits-, Licht- und Sauerstoff-Ausschluss keine Veränderung im Anthocyanprofil, Gesamtanthocyangehalt 27,6%, Gesamtpolyphenolgehalt 53,5% (Folin-Ciocalteu) sowie der antioxidativen Aktivität 3540 µmol/g (TEAC). Damit wurde gewährleistet, dass alle kooperierenden Arbeitsgruppen mit dem gleichen stabilen Ausgangsprodukt arbeiten konnten. Neben diesen wichtigen Informationen ergab ein Screening frischer Heidelbeerproben aus Deutschland keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anthocyanprofile und -gehalte in unterschiedlichen deutschen Regionen. Für die verarbeitende Industrie konnte so zumindest für den Standort Deutschland gezeigt werden, dass es keine bevorzugten Herkunftsregionen für die Heidelbeere im Sinne eines möglichst ertragreichen Rohstoffs zur Gewinnung von Heidelbeerextrakten und Produkten gibt. Außerdem konnte durch den Vergleich der Anthocyanprofile der frischen Heidelbeeren mit kommerziellen und im Labormaßstab hergestellten Extrakten die Authentizität der Extrakte und eine schonende Herstellungsweise garantiert werden.

Zur Klärung möglicher synergistischer Effekte der bioaktiven Komponenten des Heidelbeerextraktes sollte dieser in die drei Inhaltsstoffgruppen Anthocyane, Copigmente und Polymere aufgetrennt werden. Zunächst konnte gezeigt werden, dass dies durch herkömmliche Lösungsmittelextraktionen nicht vollständig gelingt. Mittels High-Speed-Countercurrent-Chromatographie (HSCCC) konnte der Extrakt zwar weitgehend in die gewünschten Subfraktionen getrennt werden, allerdings verhinderten die dafür notwendigen Zusätze von Trifluoressigsäure (TFA) den Einsatz der Subfraktionen für *in vitro*- und *in vivo*-Testungen oder in Humanstudien.

Zur vollständigen und TFA-rückstandsfreien Fraktionierung der Extrakte konnte eine membranchromatographische Methode entwickelt und erfolgreich eingesetzt werden. Diese Methode beruht auf der Adsorption der nach Ansäuern der Anthocyane erhaltenen positiv geladenen Flavylumkationen an einer mit negativ geladenen Sulfonsäuregruppen belegten Membranoberfläche. Mit dieser Kationenaustauschermembran gelang es, 99,8% der im Extrakt enthaltenen Anthocyane vollständig zu isolieren und eine hochreine Anthocyanfraktion zu gewinnen. Auf diese Weise wurden 3,7 g der Anthocyanfraktion aus 10 g Heidelbeerextrakt gewonnen. Aus der verbleibenden Permeatfraktion gelang anschließend die Isolierung der Copigmente und eine vollständige Abtrennung von den polareren polymeren Extraktbestandteilen.

Mittels dieser Vorgehensweise war es erstmals möglich, aus dem Extrakt hochreine Anthocyan-, Polymer- und Copigmentfraktionen im präparativen Maßstab zu isolieren und diese Fraktionen zu

Verkapselungszwecken sowie für biologische Studien und Testungen im Rahmen der weiteren Teilprojekte des Clusters zur Verfügung zu stellen. In den verschiedenen *in vitro*-Testsystemen zeigte vor allem die Copigmentfraktion hohe Aktivitäten und positive Effekte auf die untersuchten Biomarker in Caco-2-Zellen (Darmkrebszellen) (FEI). Weiterhin lieferten die an der Forschungsstelle 6 des Clusterprojektes durchgeführten Analysen der isolierten Polymerfraktion mittels der asymmetrischen Fluss-Feldflussfraktionierung und einem MALLS-Detektor ein durchschnittliches Molekulargewicht (M_w) von 68 kDa (FEI). Die Analytik und Bestimmung der antioxidativen Aktivität der isolierten Subfraktionen zeigte zusätzlich erste Hinweise auf die aktiven und wirksamen Verbindungen im Heidelbeerextrakt. Dabei stellte sich heraus, dass die Anthocyanfraktion mit 4,6 mmol Trolox/g und einem Anteil von 37% am Gesamtextrakt den höchsten Beitrag zur antioxidativen Aktivität des Heidelbeerextraktes (3,5 mmol Trolox/g; 100%) liefert. Auch die Copigmentfraktion (3,2 mmol Trolox/g bei einem Anteil von 15%) zeigt gegenüber den restlichen Extraktbestandteilen und den polymeren Verbindungen (2,1 mmol Trolox/g bei 29% Anteil am Gesamtextrakt) eine hohe antioxidative Aktivität. Aufgrund der hohen Aktivität der Copigmentfraktion wurde auch diese detailliert untersucht. Es konnten neben Quercetin und Chlorogensäure (5-CQA) als Hauptkomponenten, durch Anreicherung mittels LSRCCC und weitere Trennungen mittels HSCCC, unter anderem erstmals 3 neue Verbindungen aus einem Heidelbeerextrakt isoliert und mittels NMR-Spektroskopie strukturell aufgeklärt werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt war die Erfassung und Isolierung der wertgebenden Komponenten des bei der Saffherstellung anfallenden Heidelbeertresters. Dabei konnte gezeigt werden, dass unter den lipophilen Inhaltsstoffen hauptsächlich Triglyceride sowie einige bioaktive Minorkomponenten, darunter z. B. β -Amyrin, β -Sitosterol oder Oleanolsäure enthalten sind. Außerdem ließen sich durch Kombination mit der entwickelten membranchromatographischen Methode nach methanolischer Extraktion und Abtrennung der lipophilen und semipolaren Komponenten 2,6 g einer hochreinen Anthocyanfraktion aus insgesamt 120 g gefriergetrocknetem Trester gewinnen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der Trester vor allem zur Gewinnung von Anthocyanen als wertgebende Komponente, in Kombination mit den untersuchten ausbeutesteigernden Behandlungsverfahren sowie der Anreicherung mittels Membranchromatographie, für die Industrie von Nutzen sein kann.

Im Labormaßstab ließ sich die membranchromatographische Methode neben der Heidelbeere auch auf andere anthocyanhaltige Früchte und Extrakte wie z. B. Brombeeren, Cranberry, Granatapfel und Hibiskus übertragen, so dass erstmals eine neuartige Methode zur vollständigen Isolierung von Anthocyanen aus anthocyanhaltigen Früchten zur Verfügung steht, die vollständig auf giftige Lösungsmittel und Reagenzien verzichtet. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein Scale-up der Methode vom semipräparativen auf den präparativen Maßstab problemlos möglich ist, so dass auch ein weiteres Scale-up auf den industriellen Maßstab demnächst realisierbar erscheint.

5 Material und Methoden

5.1 Probenmaterial

5.1.1 Rohstoffe

Brombeeren:	Herkunft: Deutschland
Granatäpfel:	Herkunft: Türkei
Kulturheidelbeeren:	Herkunft: Deutschland, Canada
Wildheidelbeeren:	Herkunft: Deutschland, Polen, Finnland, Rumänien (siehe Tab. 3.2)
Wildheidelbeertrester:	Bayernwald Früchteverwertung GmbH (Hengersberg/Deutschland) Symrise AG (Holzminden/Deutschland)

5.1.2 Extrakte

Heidelbeerextrakt:	Kommerzieller Heidelbeerextrakt, Anthocyangehalt mind. 25%, Kaden Biochemicals GmbH, Hamburg/Deutschland
Hibiskus-Rohextrakt:	Kommerzieller wässriger Blütenextrakt von <i>Hibiscus sabdariffa</i> , Symrise AG, Holzminden/Deutschland

5.2 Chemikalien und Lösungsmittel

- Acetonitril, HPLC, Sigma Aldrich (Steinheim)
- Acetonitril, LC-MS, Honeywell GmbH (Seelze)
- Amberlite® XAD-7, Sigma Aldrich (Steinheim)
- Ameisensäure, p.a. > 98%, Acros Organics (USA)
- Anisaldehyd, zur Synthese, Merck (Darmstadt)
- 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)(ABTS), Diammoniumsalz, mind. 98%, Sigma Aldrich (Steinheim)
- n-Butanol, p.a., Fisher Scientific (Loughborough, UK)
- Citronensäure, wasserfrei, p.a., Fluka (Buchs/Schweiz)
- Chlorogensäure (Hemihydrat), purum, > 98%, Sigma Aldrich (USA)
- *p*-Cumarsäure, Sigma-Aldrich (Steinheim)
- Cyanidin-3-glucosid > 98%, Extrasynthèse (Genay Cedex/Frankreich)
- Dichlormethan, HPLC, Fisher Scientific (Loughborough, UK)
- Essigsäure (Eisessig), HPLC, 99- 100%, Mallinckrodt Baker B. V. (Deventer/Holland)
- Ethanol, absolut, mind. 99,8 Vol%, Sigma Aldrich (Steinheim) (USA)
- Ethylacetat, HPLC, Fluka (Buchs/Schweiz)
- Ethylacetat, p.a., Fisher Scientific (Loughborough, UK)
- Folin-Ciocalteu Phenolreagenz, Merck (Darmstadt)

- Gallussäure-Monohydrat, Fluka (Buchs/Schweiz)
- n-Hexan, technisch (destilliert)
- n-Hexan: für HPLC, Fluka Chemika, Buchs (Schweiz)
- Kaliumperoxodisulfat ($K_2S_2O_8$), p.a., Riedel-de Haën (Seelze)
- Methanol, HPLC, Sigma Aldrich (Steinheim)
- Methanol, technisch, destilliert
- Methanol- d_4 , mind. 99,8%, Merck (Darmstadt)
- Natriumchlorid, p.a., Sigma Aldrich (Steinheim)
- Natriumacetat, wasserfrei, p.a., Riedel de Haën (Seelze)
- Natriumhydrogencarbonat (Dihydrat), p.a., Fluka Chemika, Buchs (Schweiz)
- Quercetin (Dihydrat), Aldrich Chemical, Milwaukee (USA)
- Salzsäure, mind. 37%, Riedel de Haën (Seelze)
- tert-Butylmethylether, p.a., > 98%, Sigma Aldrich (Steinheim)
- Trifluoressigsäure, TFA, p.a., > 98%, Sigma Aldrich (Steinheim)
- Trifluoressigsäure- d_1 , 99,8%, Deutero GmbH, Kastellaun
- Trolox® (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure), purum, > 98%, Fluka, Buchs (Schweiz)
- Wasser, doppelt deionisiert, Nanopure®, Barnstead

5.3 Geräte und Parameter

5.3.1 Zerkleinerungsgeräte

Pürierstab:	Moulinex DD 1011, Stabmixer Turbo Mix
Moulinette:	Moulinex DPA141, La Moulinette

5.3.2 Photometer

Gerät:	Shimadzu UV-2101 PC UV-VIS Scanning Spectrophotometer
Software:	UV-2101PC
Küvetten:	Sarstedt Einwegküvetten, 4 mL (Makro), d = 10 mm Sarstedt Einwegküvetten, 2,5 mL (Semimikro), d = 10 mm

5.3.3 pH-Meter

Gerät:	Metrohm 605 pH-Meter
	Kalibriert mit Standard-Puffer-Lösungen pH 4,0 und pH 7,0

5.3.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie HPLC

5.3.4.1 Anlage

Pumpe:	PU-980 Plus, Intelligent HPLC Pump, Jasco (Groß-Umstadt)
Degasser:	DG-980-50, 3-Line-Degasser, Jasco (Groß-Umstadt)
Gradientenformer:	LG-980-09, Ternary Gradient Unit, Jasco (Groß-Umstadt)
Injektion:	AS-950, Intelligent Sampler, Jasco (Groß-Umstadt)
Detektor:	MD-1510, Multiwavelength Detector, Jasco (Groß-Umstadt)
Software:	ChromPass Chromatography Data System, Version 1.8.6.1, Jasco (Groß-Umstadt)

5.3.4.2 Säulen, Fließmittelsysteme und Gradienten

Methode I: Heidelbeeren HPLC-DAD und HPLC-ESI MS

Säule:	Luna 3 μ C18, 250 x 4,6 mm mit Vorsäule, Phenomenex (Aschaffenburg)
Fließmittel A:	Wasser/Acetonitril/Ameisensäure 87:3:10 (v/v/v)
Fließmittel B:	Wasser/Acetonitril/Ameisensäure 40:50:10 (v/v/v)
Flussrate:	0,5 mL/min
Gradient:	0 min 2% B, 20 min 14% B, 25 min 14% B, 40 min 18% B, 45 min 18% B, 70 min 90% B, 80 min 2% B, 90 min 2% B

Methode II: Hibiskus HPLC

Säule:	Luna 3 μ C18, 250 x 4,6 mm mit Vorsäule, Phenomenex (Aschaffenburg)
Fließmittel A:	Wasser/Acetonitril/Ameisensäure 87:3:10 (v/v/v)
Fließmittel B:	Wasser/Acetonitril/Ameisensäure 40:50:10 (v/v/v)
Flussrate:	0,5 mL/min
Gradient:	0 min 6% B, 25 min 6% B, 35 min 30% B, 45 min 100% B, 50 min 6% B, 60 min 6% B

Methode III: Hibiskus HPLC-ESI-MS

Säule:	Luna 3 μ C18 (2), 150 x 4,6 mm mit Vorsäule (Phenomenex, Aschaffenburg)
Fließmittel A:	Wasser/Acetonitril/Ameisensäure 94,5:3:2,5 (v/v/v)
Fließmittel B:	Wasser/Acetonitril/Ameisensäure 47,5:50:2,5 (v/v/v)
Flussrate:	0,09 mL/min
Gradient:	0 min 6% B, 15 min 6% B, 21 min 30% B, 27 min 100% B, 30 min 6% B, 45 min 6% B

Methode IV: Lipophile Inhaltsstoffe Heidelbeertrester

Säule:	LiChroCART®, RP-18 endcapped (5 µm), 250 x 4,6 mm, Merck
Fließmittel A:	TBME/Methanol/Wasser 4:92:4 (v/v/v)
Fließmittel B:	TBME/Methanol/Wasser 90:6:4 (v/v/v)
Flussrate:	0,8 mL/min
Gradient:	0 min 0% B, 10 min 0% B, 20 min 50% B, 40 min 100% B, 50 min 100% B, 55 min 0% B, 60 min 0% B

5.3.5 Präparative HPLC

Pumpe:	Wellchrom HPLC Pump K-1001, Knauer (Berlin)
Gradientenformer:	Solvent Organizer K-1500 mit Degasser, Knauer (Berlin)
Injektion:	Knauer 55960 (500 µL Probenschleife)
Detektor:	Wellchrom UV Detector K-2600, Knauer (Berlin)
Software:	Eurochrom 2000 für Windows Version 2.05

Methode :

Säule:	Luna 5µ C18 (2), 250 x 15 mm mit Vorsäule, Phenomenex (Aschaffenburg)
Fließmittel A:	Wasser/Acetonitril/Ameisensäure 92:3:5(v/v/v)
Fließmittel B:	Wasser/Acetonitril/Ameisensäure 45:50:5 (v/v/v)
Flussrate:	6 mL/min
Injektionsvolumen:	500 µL
Wellenlänge:	280 und 520 nm

Gradient:	polare Extraktbestandteile (Anthocyane, Chlorogensäure) 0 min 6% B, 25 min 20% B, 45 min 30% B mittelpolare Extraktbestandteile (Anthocyane, Copigmente) 0 min 6% B, 25 min 20% B, 45 min 40% B unpolarere Copigmente (Quercetin-Derivate) 0 min 6% B, 25 min 20% B, 45 min 40% B, 60 min 50%
-----------	--

5.3.6 HPLC-ESI-MS

Massenspektrometer:	Esquire-LC-MS/MS Ion Trap mit Elektrospray-Ionisierung, Bruker Daltonics GmbH (Bremen)
Pumpe:	Binäre HPLC-Pumpe, HP Series 1100, Hewlett Packard (Waldbronn)
Injektor:	Einspritzventil Rheodyne 7125 mit 20 µL Injektionsschleife, Rheodyne (Bensheim)
Detektor:	UV/Vis-Detektor L-4000, Merck Hitachi (Tokio, Japan)
Integrator:	Chromatopac C-R 6A, Shimadzu (Düsseldorf)

Ion Source Type	ESI
Ion Polarity	positiv (Anthocyane), negativ (Copigmente)
Trap Drive	54,2
Octopole RF Amplitude	130,0 Vpp
Lens 2	60,0 Volt
Dry Temp (Set)	325°C
Nebulizer (Set)	40,00 psi
Dry Gas (Set)	9,00 L/min
HV Capillary	3000 V
HV End Plate Offset	-500 V
Scan Begin	50,00 <i>m/z</i>
Scan End	2200,00 <i>m/z</i>
Max. Accu Time	200000 µs
ICC Target	50000
Datenverarbeitung:	Bruker Data Analysis, Version 3.0
<u>Methode:</u>	Methode I & III, siehe HPLC-DAD (Kapitel 5.3.4.2)

5.3.7 NMR

Die Proben wurden in deuteriertem Methanol gelöst und gemessen. Anthocyane wurden zusätzlich mit deuteriertem TFA (19:1, v/v) angesäuert. Die Kalibrierung erfolgte auf das Methanolsignal.

Gerät:	AVII-600 (Bruker Daltonik, Deutschland)
Messfrequenz:	¹ H: 600,0 MHz ¹³ C: 150,00 MHz

5.3.8 Countercurrent Chromatography (CCC)

5.3.8.1 High-speed countercurrent chromatography (HSCCC)

Gerät:	High Speed Model CCC-1000, Pharma-Tech Research (Baltimore, MD, USA)
Probenschleife:	20 und 25 mL
Pumpe:	Biotronik BT 3020, HPLC Pumpe, Jasco (Groß-Umstadt)
Detektor:	UV/Vis Detektor K-2500, Knauer (Berlin)
Schreiber:	BBC Goerz Servogor 120, 3 cm/h
Fraktionssammler:	Pharmacia LKB SuperFrac (4 min/Fraktion)
Coil:	Triplecoil, Teflonschlauch i. D. 2,5 mm; Coilvolumen 850 mL

5.3.8.2 Low-speed rotary countercurrent chromatography (LSRCCC)

Gerät:	Prototyp, Pharma-Tech Research (Baltimore, MD, USA)
Pumpe:	HPLC Pump 64, Knauer (Berlin)
Detektor:	Variable Wavelength Monitor, Knauer (Berlin)
Schreiber:	ABB Goerz SE 120, 3 cm/h
Fraktionssammler:	Pharmacia LKB SuperFrac (12 min/Fraktion)
Coil:	<p>“convoluted” Teflonschlauch i.D. 8,5 mm, Länge 107 m</p> <p>Wicklung in vier Lagen, 200 Windungen, innen 14,7 cm, außen 20,7 cm</p> <p>Coilvolumen 5,5 L</p>

5.3.9 Membranchromatographie

5.3.9.1 Vorfiltration

Membranadsorber können sich aufgrund ihrer netzartigen Struktur „zusetzen“, wenn sich Teilchen in den aufgegebenen Lösungen befinden, welche die Porengröße der Membran überschreiten. Deshalb müssen zum Schutz der Adsorber sämtliche Lösungen mit Filtern der Porengröße 0,45 oder 0,2 µm vorfiltriert werden. Für die Trennungen im semipräparativen Maßstab wurden hierzu Chromafil Einmalfilter, PET-45/25 mit 0,45 µm Porengröße, REF 729220 (Machery-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Die Vorfiltration sämtlicher für den präparativen Maßstab verwendeter Lösungen erfolgt durch das Zwischenschalten einer Sartopore 2 300 filter capsule, mit einer doppelten Membran mit Porengrößen von 0,45 und 0,2 µm (Sartorius, Göttingen, Deutschland), zwischen das Pumpsystem und die Membranadsorber Einheit. Für Extrakte mit größeren unlöslichen Partikeln erfolgte zusätzlich eine Vorfiltration über einen gebräuchlichen Faltenfilter.

5.3.9.2 Membranadsorber

Für die Membranchromatographie wurden Membranadsorber der Firma Sartorius mit der Bezeichnung Sartobind S in zwei verschiedenen Größen verwendet. Für die Methodenentwicklung kamen Sartobind S75 Membranadsorber zum Einsatz. Für das Scale-up, zur Probentrennung im präparativen Maßstab, wurden Sartobind S IEX 150 ml Adsorber eingesetzt. Eine vergleichende Übersicht über die Parameter und Herstellerangaben zu diesen Membranadsorbern findet sich in der folgenden Tab. 5.1.

Tab. 5.1: Vergleich der Parameter und Herstellerangaben der zur Membranchromatographie verwendeten Membranadsorber

	Sartobind S75	Sartobind S IEX 150 ml
Bettvolumen	2,1 mL	150 mL
Membranfläche	75 cm ²	0,55 m ²
Porengröße	3-5 µm	3-5 µm
Eingang	Luer female	Sanitary 1/2 - 3/4"
Ausgang	Luer male	Sanitary 1/2 - 3/4"
Material	Polyester	Polypropylen (PP)
Membrane	Stabilisierte verstärkte Cellulose	Stabilisierte verstärkte Cellulose
Wiederverwendbar	Ja	Ja
Membrantyp	Starker Kationenaustauscher	Starker Kationenaustauscher
Ligand	Sulfonsäure	Sulfonsäure
Ligandendichte	2 - 5 µeq/cm ²	2 - 5 µeq/cm ²
Abmessungen	25 mm	7,7 x 19 cm
Betthöhe	4 mm	8 mm
Adsorptionsfläche	75 cm ²	0,55 m ²
Bindungskapazität	Statische Bindungskapazität > 0,06 g	Typische dynamische Bindungskapazität 10% pro Einheit = 3,9 g
Flussrate bei 1 Bar	27 mL/min	
Empfohlene Flussrate	Jede Flussrate, die Sie unter Beachtung des maximalen Druckes mit Ihrem Chromatographiesystem erzielen können.	0.75 L/min
Totvolumen	1,3 mL	200 mL
Maximaler Druck	0,6 MPa	0,4 MPa
Gehäusematerial	Polysulfon	Polypropylen (PP)
pH Beständigkeit	3 - 14 (kurzzeitig), 4 - 13 (langzeitig)	3 - 14 (kurzzeitig), 4 - 13 (langzeitig)
Chemische Beständigkeit	Beständig in üblichen Chromatographie-Pufferlösungen. Peroxide und andere oxidierende oder reaktive Reagenzien sind ausgenommen.	Beständig in üblichen Chromatographie-Pufferlösungen. Peroxide und andere oxidierende oder reaktive Reagenzien sind ausgenommen.
Referenzprotein	Lysozyme	Lysozyme

5.3.9.3 Probenaufgabe/Pumpsystem Membranchromatographie

Die Probenaufgabe erfolgt im semipräparativen Maßstab mittels Einwegspritzen bei einer Flussrate von ca. 10 mL/min, im präparativen Maßstab mittels einer peristaltischen Pumpe Tandem 1082 der Firma Sartorius (Göttingen, Deutschland) bei einer Flussrate von 100 mL/min.

Parameter Pumpe Tandem 1082 (Sartorius, Göttingen, Deutschland)

Breite:	14.6 cm; Höhe: 21,6 cm; Tiefe: 27.9 cm
Gewicht:	6.4kg
Gehäuse:	Aluminum /Stahl; Korrosionsresistent, Recessed Handle.
Antrieb:	peristaltischer Pumpenkopf (Motor 600 U/min) für dickwandige Pumpenschläuche (0.090")
Flussrate:	59 bis 2258 mL/min.

5.4 Präparative Methoden

5.4.1 Trennungen mittels HSCCC

Die zur Trennung mittels HSCCC vorgesehenen Proben werden in 20 mL des Fließmittelsystems (jeweils 10 mL mobile und stationäre Phase) gelöst und anschließend vorfiltriert (siehe Kapitel 5.3.9.1). Nach Einpumpen der mittels Ultraschallbad entgasten stationären Phase wird die Probenlösung luftblasenfrei mittels einer Spritze in die Probenschleife injiziert. Anschließend wird die gewünschte Flussrate eingestellt, der Schreiber (3 cm/h) und der Fraktionssammler (4 min pro Reagenzglas) programmiert und darauf die Trennung gestartet. Dies erfolgt durch Einschalten der Pumpe, welche die Probe, und anschließend die ebenfalls entgaste mobile Phase, in Richtung Coil befördert. Gleichzeitig wird der Rotor gestartet und die gewünschte Rotationsgeschwindigkeit eingestellt. Nach Abschluss der Trennung werden die anhand des erhaltenen Chromatogrammes sowie der durchgeführten DC oder HPLC Analytik identifizierten Fraktionen vereinigt, am Rotationsverdampfer eingengt und gefriergetrocknet. Eine Übersicht über die durchgeführten Trennungen, die Trennparameter und die verwendeten Fließmittelsysteme zeigt die Tab. 5.2.

Tab. 5.2: Übersicht über die Parameter der durchgeführten HSCCC Trennungen

Trennung	Fließmittelsystem & Parameter	R _s [%]	Fraktion	M [mg]	Hauptverbindungen
Heidelbeerextrakt Kap. 3.2.2 525 mg	TBME/n-BuOH/MeCN/H ₂ O 1:3:1:5 (v/v/v/v) + 0,1% TFA Flussrate 4 mL/min 1000 U/min λ = 520 nm Modus: H - T	29,4	F1	84,0	Polymere
			F2	89,0	Polymere
			F3	86,2	Anthocyane
			F4	24,1	Anthocyane
			F5	37,6	Anthocyane
			F6	54,9	Anthocyane
			F7	17,5	Cy-3-arab
			F8	23,2	Cy-3-arab
			Coil	102,5	Copigmente

Trennung	Fließmittelsystem & Parameter	R _s [%]	Fraktion	M [mg]	Hauptverbindungen
Copigmentfraktion Kap. 3.4.1 625 mg	Hexan/Ethylacetat/MeOH/ H ₂ O 1:5:1:5 (v/v/v/v) Flussrate 3 mL/min 800 U/min $\lambda = 280$ nm Modus: H - T	36,4	F1a F1b F1c F2 F3 F4 F5 F6 F7 V8 Coil	165 50 20 6,5 22 14 15 15 21 9 57	siehe Tab. 3.6 Kap. 3.4.1
LSRCCC-Fraktion 1 Copigmente Kap. 3.4.3 670 mg	Hexan/Ethylacetat/MeOH/ H ₂ O 3:5:3:5 (v/v/v/v) Flussrate 3 mL/min 900 U/min $\lambda = 280$ nm Modus: H - T	61,2	F1 F2 F3 F4 F5 F6	53 22 39 33 35 70	Protocatechusäure Kaffeesäure Myricetin <i>p</i> -Cumarsäure Phloroglucinolaldehyd Quercetin
LSRCCC-Fraktion 7-9 Copigmente Kap. 3.4.3 950 mg	Ethylacetat/ H ₂ O 1:1 (v/v) Flussrate 3 mL/min 900 U/min $\lambda = 280$ nm Modus: H - T	68,2	F1 F2 F3 F4 F5	58 102 100 47 69	Chlorogensäure Quercetin-3-galactosid Quercetin-3-glucuronid Cumarsäure-Derivat* Gallussäure Depsid*
LSRCCC-Coil-Fraktion 1 Copigmente Kap. 3.4.3 630 mg	Ethylacetat/n-BuOH/H ₂ O 1:1:1 (v/v/v) Flussrate 3 mL/min 900 U/min $\lambda = 280$ nm Modus: H - T	61,2	F1 F2	25 107	Chlorogensäure Cumaroyl-Iridoid*
Hexanextrakt Heidelbeertrester 2 Trennungen Kap. 3.6.1 3 g	Hexan/Acetonitril 1:1 (v/v) Flussrate 3 mL/min 900 U/min $\lambda = 210$ nm Modus: H - T	89,4	siehe Kap. 3.6.1	siehe Kap. 3.6.1	siehe Kap. 3.6.1
Dichlormethanextrakt Heidelbeertrester Kap. 3.6.2 3 g	Hexan/Acetonitril 1:1 (v/v) Flussrate 3 mL/min 900 U/min $\lambda = 210$ nm Modus: H - T	89,4	siehe Kap. 3.6.2	siehe Kap. 3.6.2	siehe Kap. 3.6.2

*siehe Kapitel 3.4.3

5.4.2 Trennungen mittels LSRCCC

Eine Übersicht über die durchgeführten Trennungen, die Trennparameter und das verwendete Fließmittelsystem zeigt die Tab. 5.3.

Tab. 5.3: Übersicht über die Parameter der durchgeführten LSRCCC-Trennungen.

Trennung	Fließmittelsystem & Parameter	R _s [%]	Fraktion	M [mg]	Hauptverbindungen
Copigment-fraktion Kap. 3.4.2 11,3 g	Hexan/Ethylacetat/MeOH /Wasser 1:5:1:5 (v/v/v/v) Flussrate 5 mL/min 50 U/min $\lambda = 280, 320, 520$ nm Modus: U-O-T nach 4 h U-O-H	7,3	F1	670	1 - 6 *
			F2	404	1 - 6 *
			F3	976	1 - 6 *
			F4	777	4 - 11 *
			F5	473	4 - 6, 9 - 15 *
			F6	778	4 - 5, 12 - 17 *
			F7	312	15, 18 - 19 *
			F8	208	18 - 21 *
			F9	454	18 - 22 *
			F10	337	20 - 22 *
			F11	693	20 - 22 *
			F12	252	20 - 22 *
			F13	213	20 + 22 *
			F14	633	23 - 25 *
			Coil 1	551	23 - 25 *
			Coil 2	1574	Anthocyane & Polymere
Heidelbeerextrakt Kap: 3.3 25,0 g	TBME/n-BuOH/ACN/Wasser 1:3:1:5 + 0,1% TFA (v/v/v/v) Flussrate 5 mL/min 65 U/min $\lambda = 280, 320, 520$ nm Modus: L-I-T	61,8	F1	4740	Anthocyane & Polymere
			F2	3320	Anthocyane
			F3	1180	Anthocyane
			F4	1350	Anthocyane
			F5	1450	Anthocyane
			F6	980	Anthocyane
			F7	1280	Anthocyane
			F8	650	Anthocyane
			F9	1120	Anthocyane
			F10	510	Anthocyane
			F11	360	Anthocyane
			F12	180	Anthocyane
			F13	300	Anthocyane
			F14	280	Anthocyane
			F15	140	Cy-3-arab & Copigmente
			F16	240	Cy-3-arab & Copigmente
			Coil	5830	Copigmente

* siehe Tab. 3.8 Kapitel 3.4.2

Die zur Trennung mittels LSRCCC vorgesehenen Proben werden eingewogen und anschließend in jeweils 100 mL der mobilen und stationären Phase gelöst. Der Coil wird durch Einpumpen der im Ultraschallbad entgasten stationären Phase luftblasenfrei gefüllt, bevor die ebenfalls entgaste und gut filtrierte Probenlösung mit Hilfe einer Woulff'schen Flasche und Stickstoff injiziert wird. Hierbei wird darauf geachtet, das Eindringen von Luftblasen während der Injektion zu verhindern. Anschließend wird die gewünschte Flussrate eingestellt, der Schreiber (1 cm/h) und der

Fraktionssammler (12 min pro Reagenzglas) programmiert und die Trennung gestartet. Dabei wird der Coil durch Starten des Rotors mit der gewünschten Rotationsrichtung und Rotationsgeschwindigkeit in Bewegung gesetzt, während die ebenfalls entgaste mobile Phase durch Einschalten der Pumpe zum Coil gefördert wird. Nach Abschluss der Trennung werden die anhand des erhaltenen Chromatogrammes, der durchgeführten DC oder HPLC Analytik identifizierten Fraktionen vereinigt, am Rotationsverdampfer eingeeengt und gefriergetrocknet.

5.4.3 Membranchromatographie

5.4.3.1 Durchführung der Membranchromatographie (semipräparativer Maßstab)

Für Trennungen im semipräparativen Maßstab (Extraktmenge < 200 mg) werden Membranadsorber des Typs Sartobind S75 verwendet (siehe Kapitel 5.3.9.2). Es handelt sich hierbei um Adsorber-Spritzenvorsätze, weshalb die Probenaufgabe von Hand unter Verwendung einer gebräuchlichen 30 mL Einwegspritze mit einer Flussrate von ca. 10 mL/min. erfolgt.

Zur Herstellung der Extraktlösung wird der Extrakt in einer stets frisch zubereiteten Mischung aus Methanol/Eisessig bzw. Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v) oder in wässriger HCl (pH 2) gelöst und Lösungen der Konzentrationen 1 g/L bis 10g/L hergestellt. Für die Membranchromatographie von Säften werden diese mit HCl auf pH 2 angesäuert. Anschließend ist eine Vorfiltration der Extraktlösung bzw. des Saftes obligatorisch (siehe Kapitel 5.3.9.1).

Vor der Probenaufgabe sind einige Regenerations- und Äquilibrationsschritte notwendig, die auch bei fabrikneuen Membranadsorbereinheiten unbedingt einzuhalten sind, da diese zum Schutz der Membran mit Glycerol benetzt sind. Das Glycerol muss zur erfolgreichen Trennung unbedingt vorher entfernt werden. Zunächst erfolgt die Regeneration und Reinigung der Adsorbereinheit mit 60 mL 1 N NaOH. Es empfiehlt sich, zunächst die Adsorbereinheit etwas in die NaOH-Lösung zu tauchen, und durch Ziehen an der Spritze einen Unterdruck zu erzeugen, der die NaOH-Lösung rückwärts durch die Membranadsorbereinheit zieht. Dadurch werden sämtliche Luftblasen aus der Membranadsorbereinheit gezogen und es wird gewährleistet, dass die gesamte Membranoberfläche genutzt wird. Ist die Membranadsorbereinheit luftblasenfrei, so kann die Spritze abgenommen, mit der NaOH Lösung gefüllt und nun vorwärts auf den Adsorber aufgegeben werden. Anschließend erfolgt eine Kalibrierung in zwei Schritten mit (a) 60 mL 0,01 N Salzsäurelösung sowie (b) 30 mL des methanolischen bzw. ethanolischen Extraktlösungsmittels, bei Säften und wässrigen Extraktlösungen entsprechend nur mit wässriger HCl.

Erst jetzt erfolgt die unmittelbare Aufgabe der Extraktlösung. Hier gibt es je nach Verwendungszweck zwei Möglichkeiten:

Für **Möglichkeit A**, die **Isolation einer reinen Anthocyanfraktion** aus Extrakten oder Säften, wird die Extraktlösung so lange auf den Membranadsorber aufgegeben, bis dieser seine maximale Kapazität erreicht hat, d.h. bis die Anthocyan-Konzentration der austretenden Lösung identisch mit der aufgegebenen Lösung ist (100% Wert). Aufgrund der starken Färbung der Anthocyane lässt sich dies sehr gut visuell, genauer auch sehr schnell photometrisch bei 520 nm bestimmen.

Für **Möglichkeit B**, die **zusätzliche Isolation einer anthocyanfreien Copigment- und Polymerfraktion**, wird der Membranadsorber nur bis zum Durchbruchpunkt, dem Punkt, an dem die

Anthocyankonzentration in der austretenden Lösung sichtlich ansteigt, beladen. Im Falle von Heidelbeerextrakt ist dies nach 8 mL (Konz. 10 g/L) bzw. 80 mL (Konz. 1 g/L) der Probenlösung (entsprechend 80 mg Heidelbeerextrakt, Anthocyangehalt 27,6%) der Fall. Bei Extrakten geringerer Anthocyankonzentration kann entsprechend mehr Extraktlösung aufgegeben werden. Bis zu diesem Zeitpunkt werden > 99% der aufgegebenen Anthocyane auf der Adsorbereinheit retardiert und somit aus der Extraktlösung entfernt. Dadurch wird eine nahezu anthocyanfreie Copigment- und Polymerfraktion erhalten. Restliche Anthocyane in dieser Lösung können durch eine zweite Membranchromatographie oder durch Reihenschaltung von zwei Adsorbereinheiten eliminiert werden.

Zur Ermittlung von Retentionsstudien und Durchbruchkurven werden während der Membranchromatographie von der aus dem Adsorber austretenden Lösung Proben genommen und wie in Kapitel 5.5.2 beschrieben analysiert.

Zur Entfernung von Copigmenten und anderen nichtgeladenen Verbindungen von der Membranadsorbereinheit folgt vor der Elution der retardierten Anthocyane ein Spülschritt mit 30 mL des Extraktlösungsmittels Methanol/Eisessig bzw. Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v). Für die anschließende Elution der Anthocyane werden 80 mL einer Mischung aus 1 M wässriger NaCl-Lösung und Methanol bzw. Ethanol in einem Mischungsverhältnis von 1:1 (v/v) verwendet. Nach der Elution ist ein sofortiges Ansäuern der Lösung mit konz. Essigsäure auf einen Essigsäuregesamtgehalt von 1 Vol-% erforderlich, um die in der neutralen Salzlösung vorliegenden Anthocyane zu stabilisieren. Anschließend kann der Membranadsorber wieder regeneriert und für eine zweite membranchromatographische Trennung genutzt werden.

Für die Lagerung wird die Adsorbereinheit mit einer Mischung aus 1 M wässriger NaCl-Lösung und Ethanol 2:8 (v/v) gespült und bei Raumtemperatur gelagert. Die erhaltenen Copigment- und Anthocyanfraktionen werden anschließend am Rotationsverdampfer bei max. 40 °C vom Lösungsmittel befreit und gefriergetrocknet.

5.4.3.2 Durchführung der Membranchromatographie (präparativer Maßstab)

Für Trennungen im präparativen Maßstab (Extraktmengen von 1 - 25 g) werden Membranadsorber des Typ Sartobind S IEX 150 ml verwendet (siehe Kapitel 5.3.9.2). Hier erfolgt die Probenaufgabe mittels einer peristaltischen Pumpe mit einer Flussrate von 100 mL/min (siehe Kapitel 5.3.9.3).

Zur Herstellung der Extraktlösung wird der Extrakt in einer stets frisch zubereiteten Mischung aus Methanol/Eisessig bzw. Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v) oder in wässriger HCl (pH 2) gelöst und Lösungen der Konzentrationen 1 g/L bis 10g/L hergestellt. Für die Membranchromatographie von Säften werden diese mit HCl auf pH 2 angesäuert. Anschließend ist eine Vorfiltration der Extraktlösung bzw. des Saftes obligatorisch (siehe Kapitel 5.3.9.1).

Wie auch im semipräparativen Maßstab sind vor der Probenaufgabe zunächst einige Regenerations- und Äquilibrationsschritte notwendig, die auch bei neuen Membranadsorbereinheiten zur Entfernung des Glycerols unbedingt einzuhalten sind (vgl. 5.4.3.1). Zunächst erfolgt die Regeneration und Reinigung der Adsorbereinheit mit 2,5 L 1 N NaOH. Gleichzeitig sollte die Membranadsorbereinheit entlüftet werden. Dadurch wird gewährleistet, dass die gesamte Membranoberfläche genutzt wird. Bewährt hat sich dabei, zunächst das obere Entlüftungsventil zu

öffnen, bis sämtliche Luft aus der Adsorbereinheit verdrängt wird, dieses anschließend zu schließen, 1 Min. nur das untere, und abschließend noch mal 1 Min. das obere Ventil zu öffnen. Anschließend sollte der Membranadsorber luftblasenfrei sein. Jetzt kann, unter Verschluss der beiden Entlüftungsventile, mit 1 N NaOH-Lösung weiter gespült werden. Anschließend erfolgt die zweischrittige Equilibrierung mit (a) 2,5 L 0,01 N Salzsäurelösung sowie (b) 1 L des methanolischen bzw. ethanolischen Extraktlösungsmittels, bei Säften und wässrigen Extraktlösungen entsprechend nur mit wässriger HCl (pH 2).

Während für die Spül- und Equilibrierungsschritte auch höhere Flussraten von bis zu 500 mL/min gewählt werden können, so sollte für die Probenaufgabe und die folgenden Schritte einschließlich der Elution die angegebene Flussrate von 100 mL/min nicht überschritten werden. Höhere Flussraten führen zu einer schlechteren Retention und geringeren dynamischen Bindungskapazität der Anthocyane auf dem Membranadsorber.

Unmittelbar danach erfolgt die Aufgabe der Extraktlösung. Hier gibt es, genau wie im semipräparativen Maßstab, zwei Möglichkeiten:

Für **Möglichkeit A**, die **Isolation einer reinen Anthocyanfraktion** aus Extrakten oder Säften, wird die Extraktlösung so lange auf den Membranadsorber aufgegeben, bis dieser seine maximale Kapazität erreicht hat, d.h. bis die Anthocyan-Konzentration der austretenden Lösung identisch mit der aufgegebenen Lösung ist (100% Wert). Aufgrund der starken Färbung der Anthocyane lässt sich dies sehr gut visuell, etwas genauer auch sehr schnell photometrisch bei 520 nm bestimmen.

Für **Möglichkeit B**, die **zusätzliche Isolation** einer möglichst **anthocyanfreien Copigment- und Polymerfraktion**, wird der Membranadsorber nur bis zum Durchbruchpunkt, dem Punkt, an dem die Anthocyankonzentration in der austretenden Lösung sichtlich ansteigt, beladen. Im Falle von Heidelbeerextrakt ist dies nach 1 L (Konz. 10 g/L) der Probelösung (entsprechend 10 g Heidelbeerextrakt, Anthocyan Gehalt 27,6%) der Fall. Bei Extrakten geringerer Anthocyankonzentration kann entsprechend mehr Extraktlösung aufgegeben werden. Bis zu diesem Zeitpunkt werden > 98% der aufgegebenen Anthocyane auf der Adsorbereinheit retardiert und somit aus der Extraktlösung entfernt. Dadurch wird eine nahezu anthocyanfreie Copigment- und Polymerfraktion (Permeat) erhalten. Restliche Anthocyane in dieser Lösung können durch eine zweite Membranchromatographie oder durch Reihenschaltung von zwei Adsorbereinheiten eliminiert werden.

Zur Ermittlung von Retentionsstudien und Durchbruchkurven (siehe Kapitel 5.5.2) werden während der Membranchromatographie von der aus dem Adsorber austretenden Lösung Proben genommen und wie in Kapitel 5.5.2 beschrieben analysiert.

Zur Entfernung von Copigmenten und anderen nichtgeladenen Verbindungen von der Membranadsorbereinheit folgt vor der Elution der retardierten Anthocyane ein Spülschritt mit 1 L des Extraktlösungsmittels Methanol/Eisessig bzw. Ethanol/Eisessig 19:1 (v/v). Für die anschließende Elution der Anthocyane werden 1 L einer Mischung aus 1 M wässriger NaCl-Lösung und Methanol bzw. Ethanol in einem Mischungsverhältnis von 1:1 (v/v) verwendet. Nach der Elution ist ein sofortiges Ansäuern der Lösung mit konz. Essigsäure auf einen Gesamtessigsäuregehalt von 1 Vol% erforderlich, um die in der neutralen Salzlösung vorliegenden Anthocyane zu stabilisieren. Anschließend kann der Membranadsorber wieder regeneriert und für eine zweite membranchromatographische Trennung genutzt werden.

Für die Lagerung wird er mit einer Mischung aus 1 M wässriger NaCl-Lösung und Ethanol 2:8 (v/v) gespült und bei Raumtemperatur gelagert. Die erhaltene Copigment- und Anthocyanfraktion wird anschließend am Rotationsverdampfer bei max. 40 °C vom Lösungsmittel befreit und gefriergetrocknet.

5.4.4 Gewinnung von Rohextrakten aus frischen Früchten

Frische und gefrorene Früchte oder Blüten werden in flüssigem Stickstoff gefrostet und mittels der unter 5.3.1 genannten Hilfsmittel zerkleinert. Das zerkleinerte Material wird sofort vor dem Auftauen in Methanol/Eisessig 19:1 (v/v) aufgenommen. Unter Rühren wird nun mehrfach bis zur Farblosigkeit der Extraktionslösung extrahiert, um eine vollständige Erfassung aller phenolischen Verbindungen zu erreichen. Die Extraktlösungen werden anschließend vereinigt, das Lösungsmittel schonend (max. 35°C) am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in H₂O aufgenommen und nach Gefriertrocknung wird der Rohextrakt erhalten.

5.4.5 Anreicherung von Polyphenolen mittels Amberlite® XAD-7

Die Anreicherung von phenolischen Verbindungen aus Säften und Rohextrakten erfolgt mittels Adsorptionschromatographie an Amberlite® XAD-7 Material. Durch diese Methode werden phenolische Verbindungen angereichert und von nicht erwünschten, in den Rohextrakten vorhandenen Verbindungen wie Fruchtsäuren, Zuckern und Salzen getrennt. Aufgrund dessen eignen sich diese XAD-7 Extrakte besonders gut für die membranchromatographische Trennung von Anthocyanen und Copigmenten, da sämtliche die Trennung beeinflussende positiv geladene Kationen durch die Anreicherung entfernt werden (vergl. Kapitel 3.5.4.1).

Zur Herstellung der XAD-7-Extrakte wird eine Säule (120 cm x 6 cm) mit Amberlite® XAD-7 HP (Sigma, St. Louis, MO) gefüllt, mit Methanol bzw. Ethanol gewaschen und über Nacht mit 5 L Wasser/Eisessig (995:5, v/v) equilibriert. Die in Wasser/Eisessig (995:5, v/v) gelösten Rohextrakte (10-100 g) oder Säfte werden anschließend so lange auf die Säule aufgegeben, bis diese zu 2/3 beladen ist. Zur vollständigen Entfernung des Salzes wird die Säule mit mind. 3 L Wasser/Eisessig (995:5, v/v) gespült.

Anschließend werden die Polyphenole mit Methanol bzw. Ethanol/Eisessig (19:1, v/v) eluiert. Durch Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und Gefriertrocknung wird der XAD-7-Extrakt erhalten. Für eine anschließende membranchromatographische Trennung kann die Elutionslösung bei schneller Weiterverarbeitung auch direkt zur Membranchromatographie eingesetzt werden (siehe Kapitel 3.5.4.1).

5.4.6 Entsalzen der Anthocyanfraktionen

Die aus der Membranchromatographie erhaltenen Anthocyanfraktionen enthalten NaCl, aufgrund der Elution mit einer NaCl-haltigen Elutionslösung. Zur Entfernung des NaCl kann analog der Herstellung von XAD-7-Extrakten die Adsorption der Anthocyane an Amberlite® XAD-7 Material verwendet werden.

Wie unter 5.4.5 beschrieben wird zunächst die Säule vorbereitet und equilibriert. Die salzhaltigen Anthocyanfraktionen (1-10 g) werden anschließend in 500 mL Wasser/Eisessig (995:5, v/v) gelöst und

auf die Säule gegeben. Zur vollständigen Entfernung des Salzes wird die Säule mit mind. 3 L Wasser/Eisessig (995:5, v/v) gespült.

Anschließend werden die Anthocyane mit Ethanol/Eisessig (19:1, v/v) eluiert. Durch Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und Gefriertrocknung erhält man die salzfreie Anthocyanfraktion. Für die Reinigung von kleineren Mengen (0,1 bis 1 g) können Säulen der Größe 60 cm x 3 cm verwendet und die Mengen an Lösungsmittel entsprechend reduziert werden.

5.4.7 Lösungsmittlextraktion der Copigmente

Um Copigmente aus gewonnenen XAD-7 Extrakten anzureichern, eignet sich eine Extraktion mit Ethylacetat. Zu diesem Zweck werden Mengen von 1-10 g Extrakt in 1L eines Wasser/Methanol-Gemisches 4:1 (v/v) bzw. Wasser/Ethanol-Gemisches 4:1 (v/v) gelöst. Eine repetitive Flüssig-Flüssig-Extraktion, 3x mit jeweils 1 Liter Ethylacetat, ermöglicht eine Trennung der weniger polaren Copigmente von den polarerer und polymeren Extraktbestandteilen. Durch schonendes Abtrennen der Lösungsmittel am Rotationsverdampfer, bei höchstens 35°C und anschließender Gefriertrocknung, wird aus der Ethylacetatphase die Copigmentfraktion erhalten. Die polarerer Verbindungen, darunter die Anthocyane und polymeren Extraktbestandteile, bleiben in der wässrigen Phase zurück und werden ebenfalls nach Gefriertrocknung erhalten.

Diese Methode eignet sich ebenfalls zur Trennung von Copigmenten und Polymeren aus der nach Abtrennung der Anthocyane mittels Membranchromatographie erhaltenen Permeatfraktion. Weiterhin bietet sich mit dieser Methode die Möglichkeit, Anthocyane und Anthocyanidine (Aglykone) aus der nach der Membranchromatographie erhaltenen Retentatfraktion aufgrund ihrer unterschiedlichen Polaritäten zu trennen.

5.4.8 Hexanfällung der polymeren Extraktbestandteile

Die Hexanfällung dient dazu, höher molekulare phenolische Inhaltsstoffe von anderen Extraktbestandteilen abzutrennen. Der Mechanismus beruht darauf, dass sich mit dem Polymerisationsgrad die Löslichkeit der phenolischen Verbindungen in polaren Lösungsmitteln erhöht, während sie in unpolarerer Lösungsmitteln abnimmt. Durch Lösen der Extrakte in Ethanol und Hinzutropfen von Hexan wird die Polarität der Lösung langsam erniedrigt, so dass zuerst die polymeren, anschließend die oligomeren und schließlich auch die monomeren phenolischen Verbindungen ausfallen (Köhler, 2006).

Für die Hexanfällung werden 1 bis 5 g der polymerhaltigen Extrakte oder Extraktfraktionen für 1 Std. unter Rühren bei Raumtemperatur in 1L Ethanol gelöst. Anschließend wird der unlösliche Rückstand abfiltriert. Durch langsames Zutropfen von 1 L Hexan (ca. 10 mL/min), werden unter Rühren bei Raumtemperatur die polarerer polymeren Bestandteile ausgefällt. Nach vollständiger Zugabe des Hexans wird weitere 30 min gerührt. Danach wird zur Gewinnung der Polymerfraktion das Präzipitat abfiltriert. Das Präzipitat wird in Nanopure® Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer eingengt, in Nanopure® Wasser aufgenommen und ebenfalls gefriergetrocknet.

5.5 Analytische und quantitative Methoden

5.5.1 Bestimmungen mittels HPLC-DAD

Die quantitative Bestimmung der Anthocyangehalte erfolgte als Cyanidin-3-glucosid-Äquivalente mittels eines Cyanidin-3-glucosid-Standards. Die Chlorogensäuregehalte wurden mittels eines Chlorogensäurestandards quantifiziert. Die quantitative Bestimmung der übrigen Copigmente erfolgte entweder als Gallussäure- oder als Quercetin-3-glucosid-Äquivalente durch die Erstellung einer Kalibriergeraden mit der entsprechenden Reinsubstanz.

a) Herstellen der Lösungen:

- Probenlösungen:

FrISCHE und behandelte Heidelbeeren werden tiefgekühlt mit einem Pürierstab zerkleinert, eine definierte Menge von ca. 20 g abgewogen und jeweils zweimal 1 Std. unter Rühren bei Raumtemperatur mit 100 mL des HPLC-Fließmittels A (Kapitel 5.3.4.2, Methode I) extrahiert. Durch längere Extraktionszeiten oder andere der zahlreichen in der Literatur beschriebenen Extraktionsmethoden für Anthocyane konnte im Rahmen einer Versuchsreihe keine Erhöhung der Anthocyanausbeuten festgestellt werden. Die Extraktion mit dem Fließmittel A eignet sich deshalb besonders gut für die Quantifizierung, weil die filtrierten Lösungen anschließend direkt zur Bestimmung mittels HPLC eingesetzt werden konnten. Der für die Quantifizierung der Anthocyane zu berücksichtigende Eigenanteil an Wasser der frischen Heidelbeerproben wurde aus dem Trockensubstanzgehalt (siehe Kapitel 5.5.5.1) berechnet, und für die quantitative Bestimmung dem Extraktionsmittelvolumen hinzugerechnet.

Für die Bestimmung der Anthocyan- und Copigmentgehalte in kommerziellen Extrakten, XAD-7-Extrakten und Extraktfraktionen werden diese in definierter Menge in Messkolben eingewogen, zunächst in FM B (Kapitel 5.3.4.2, Methode I) gelöst und anschließend mit FM A bis zur Marke aufgefüllt. Dabei soll das Verhältnis von FM B zu FM A 20:80 (v/v) betragen.

Säfte werden je nach erwarteter Konzentration an Anthocyanen und Copigmenten 1:2 bis 1:50 (v/v) mit Nanopure® Wasser verdünnt und nach Membranfiltration direkt zur Bestimmung mittels HPLC eingesetzt.

- Standardlösungen:

Durch Einwiegen einer definierten Menge der Reinsubstanz in einen Messkolben wird eine Stammlösung hergestellt, indem die Proben zunächst in Fließmittel B gelöst (Kapitel 5.3.4.2, Methode I) und anschließend mit Fließmittel A bis zur Marke aufgefüllt werden. Auch hier sollte das Verhältnis von FM B zu FM A 20:80 (v/v) betragen.

Aus dieser Stammlösung werden die Kalibrierlösungen im Konzentrationsbereich zwischen 2 mg/L – 200 mg/L hergestellt.

Die Tab. 5.4 zeigt das ermittelte Bestimmtheitsmaß, die Nachweisgrenze [mg/L] und die Bestimmungsgrenze [mg/L] nach DIN-Norm 32645 für die einzelnen Verbindungen.

Tab. 5.4: Bestimmtheitsmaß, Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze nach DIN-Norm 32645

	Bestimmtheitsmaß [R^2]	Nachweisgrenze [mg/L]	Bestimmungsgrenze [mg/L]
Cyanidin-3-glucosid	0,9996	6,5	26,4
Chlorogensäure	0,9996	4,8	19,2
Gallussäure	0,9997	4,2	16,4
Quercetin-3-glucosid	0,9998	3,2	12,9

b) Versuchsdurchführung:

Die Proben werden an der HPLC-DAD-Anlage (Kapitel 5.3.4) sowie mit der Methode I (Kapitel 5.3.4.2) gemessen. Die Detektionswellenlänge für die Anthocyane betrug 520 nm. Die Phenolcarbonsäuren wurden als Gallussäure-Äquivalente bei der Detektionswellenlänge von 280 nm quantifiziert. Für die Chlorogensäure betrug die Detektionswellenlänge 320 nm und für Quercetinderivate 351 nm. Es wurden von jeder Probe mind. Doppelbestimmungen durchgeführt.

c) Auswertung:

Aus den erhaltenen Peakflächen der Standardlösungen und deren Konzentrationen wurde eine Regressionsgerade berechnet. Diese Geradengleichung diente als Kalibrierfunktion für die quantitative Auswertung.

5.5.2 Retentionsstudien Membranchromatographie

Zur Ermittlung von Durchbruchskurven, zur Erfassung der Retention einzelner Verbindungen sowie zur Erfassung der dynamischen Bindungskapazität (siehe Kapitel 2.3.4) der verwendeten Membranadsorber werden von der aus der Adsorbereinheit austretenden Lösung, während der Probenaufgabe bzw. während des Spül- und Elutions-Schrittes, Proben von jeweils 1 mL genommen. Im semipräparativen Maßstab erfolgte dies nach jeweils 10 mL, im präparativen Maßstab nach jeweils 100 mL Lösungsvolumen. Das Volumen der austretenden Lösung wird dabei durch Einleiten in einen Messzylinder bestimmt. Die genommenen Proben werden in HPLC Vials zur Entfernung der Lösungsmittel unter Stickstoff getrocknet, um Oxidationen der Polyphenole zu verhindern. Für die Analytik mittels HPLC werden die Proben anschließend im gleichen Volumen des HPLC-Fließmittels gelöst, bevor mittels HPLC die quantitative Bestimmung der Zielverbindungen erfolgt (siehe Kapitel 5.5.1). Aus dem Verhältnis der Konzentration in der austretenden Lösung zur Konzentration in der aufgegebenen Probelösung kann die Retention zum aktuellen Zeitpunkt berechnet werden. Zur Ermittlung von Durchbruchskurven für Anthocyane kann die Gesamtkonzentration in den Lösungen auch photometrisch ermittelt (siehe Kapitel 5.5.4.1) und graphisch aufgetragen werden.

5.5.3 Dünnschichtchromatographie (DC)**5.5.3.1 Dünnschichtchromatographie zur Analytik von Anthocyanen**

Träger: Kieselgel 60 (F₂₅₄) auf Aluminiumfolien, Merck (Darmstadt)
 Laufmittel: Ethylacetat/Ethylmethyleketon/Ameisensäure/Wasser 40:35:10:10 (v/v/v/v)
 Detektion: UV-Licht (366 nm bzw. 254 nm)
 Anisaldehyd Schwefelsäure-Reagenz (Stahl, 1967)

5.5.3.2 Dünnschichtchromatographie zur Analytik lipophiler Verbindungen aus Heidelbeertrester

Träger: Kieselgel 60 (F₂₅₄) auf Aluminiumfolien, Merck (Darmstadt)
 Laufmittel I: Dichlormethan/Aceton im Verhältnis 19:1 (v/v)
 Laufmittel II: Dichlormethan/Hexan im Verhältnis 9:1 (v/v)
 Detektion: UV-Licht (366 nm bzw. 254 nm)
 Anisaldehyd Schwefelsäure-Reagenz (Stahl, 1967)

5.5.4 Photometrische Methoden

5.5.4.1 Bestimmung des Anthocyangehaltes mittels pH-Differentialmethode

Die photometrische Bestimmung des Gesamtanthocyangehaltes erfolgte nach der pH-Differentialmethode in Anlehnung an die Methode nach Lee et al. (2005). Das Prinzip der Methode beruht auf der reversiblen Entfärbung der Anthocyane durch eine Verschiebung des pH-Wertes zwischen dem farbigen Flavyliumkation (pH 1) und der farblosen Carbinolbase (pH 4,5). Die Adsorptionsdifferenz ist proportional zur Anthocyankonzentration. Aus der Adsorptionsdifferenz wird die Anthocyankonzentration als Cyanidin-3-glucosid-Äquivalente errechnet. Dies erfolgt entweder mittels einer Kalibriergeraden oder durch den für Cyanidin-3-glc bekannten molaren Adsorptionskoeffizienten. Im letzteren Fall wird das Photometer in regelmäßigen Abständen durch einen Cyanidin-3-glucosid Standard und einer Kalibrierreihe hinsichtlich der Extinktion und Linearität in Verbindung mit dem molaren Extinktionskoeffizienten überprüft.

Geräte und Reagenzien

pH-Meter siehe Kapitel 5.3.3

UV/Vis Spektrometer (siehe Kapitel 5.3.2), Wellenlänge 520 nm, geeicht mit Cyanidin-3-glucosid Standard.

Lösung A: pH 1,0-Puffer (Kaliumchlorid, 0,025 M)

Es werden 1.86 g KCl in ein Becherglas eingewogen und mit destilliertem Wasser auf 980 mL aufgefüllt. Anschließend wird der pH-Wert der Lösung mit ca. 6,3 mL HCl auf pH 1,0 ($\pm 0,05$) eingestellt. Abschließend wird die Lösung in einen 1 L Messkolben überführt und mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 1 L aufgefüllt.

Lösung B: pH 4,5-Puffer (Natriumacetat, 0,4 M)

Es werden 54,43 g Natriumacetat ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$) in ein Becherglas eingewogen und mit destilliertem Wasser auf 960 mL aufgefüllt. Anschließend wird der pH-Wert der Lösung mit ca. 20 mL HCl auf pH 4,5 ($\pm 0,05$) eingestellt. Abschließend wird die Lösung in einen 1 L Messkolben überführt und mit destilliertem Wasser auf Volumen von 1 L aufgefüllt.

Durchführung

Bei festen Proben wird die Probe, 50-150 mg, in einen 50 mL Messkolben eingewogen und durch Auffüllen mit destilliertem Wasser eine Probenlösung bekannter Konzentration hergestellt. Im Anschluss wird mittels einer Pipette eine Verdünnungsreihe mit der Pufferlösung A hergestellt, bis sich die Extinktion der Lösung im linearen Bereich des Spektralphotometers befindet (0,2 bis 1,4 AU, mit Cyanidin-3-glucosid-Standard zu eichen). Das Verhältnis von 1:4 (v/v) zwischen Probe und Pufferlösung darf nicht überschritten werden, so dass immer mindestens 80% der Pufferlösung in der verdünnten Probe vorhanden ist. Mit dem ermittelten idealen Verdünnungsverhältnis werden von jeder Probe zwei Verdünnungen, jeweils bei pH 1, mit der Pufferlösung A, und bei pH 4,5 mit der Pufferlösung B, hergestellt.

Die Absorptionen der beiden verdünnten Testlösungen werden 20 min nach deren Herstellung jeweils bei 520 und 700 nm photometrisch gegen destilliertes Wasser gemessen.

Berechnung:

Die Berechnung des Anthocyangehaltes der Probenlösung erfolgt als Cyanidin-3-glucosid-Äquivalente in mg/L nach der folgenden Formel:

$$C = \frac{A * MG * VF * 10^3}{\epsilon * l}$$

mit: $A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH1,0} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH4,5}$

MG = Molekulargewicht (Cyanidin-3-glucosid) = 449,2 g/mol

VF = Verdünnungsfaktor

l = Weglänge durch Küvette in cm

10^3 = Faktor für Umrechnung von g zu mg

c = Konzentration Probelösung in [mg/L]

ϵ = 26 900, molarer Extinktionskoeffizient für Cyanidin-3-glucosid in [L * mol⁻¹ * cm⁻¹]

5.5.4.2 Bestimmung des molaren Absorptionskoeffizienten

Die Bestimmung des molaren Adsorptionskoeffizienten ϵ für Anthocyane erfolgt ebenfalls nach der pH-Differentialmethode, indem eine Probenlösung bekannter Konzentration mit dem für die Bestimmung vorgesehenen Anthocyan hergestellt wird. Alle weiteren Schritte erfolgen wie im vorangehenden Kapitel beschrieben. Zur Berechnung des molaren Adsorptionskoeffizienten wird die im vorigen Kapitel gezeigte Gleichung wie folgt umgestellt:

$$\epsilon = \frac{A * MG * VF * 10^3}{c * l}$$

mit: $A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH1,0} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH4,5}$

MG = Molekulargewicht (Cyanidin-3-glucosid) = 449,2 g/mol

VF = Verdünnungsfaktor

l = Weglänge durch Küvette in cm

10^3 = Faktor für Umrechnung von g zu mg

c = Konzentration Probelösung in [mg/L]

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient in [$L * mol^{-1} * cm^{-1}$]

5.5.4.3 Bestimmung der antioxidativen Aktivität (TEAC-Assay)

Die Bestimmung der antioxidativen Aktivität erfolgt mittels TEAC-Assay (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) in Anlehnung an die Methode nach Re et al. (1999).

a) Herstellen der Lösungen:

- Probelösungen:

Für die Herstellung der Probelösungen werden bei festen Proben, wie z. B. Extrakten und Extraktfraktionen, 10 mg Probe auf 0,1 mg genau in einen 100 mL Messkolben eingewogen und bis zur Marke mit Nanopure® Wasser aufgefüllt.

Bei der Bestimmung aus frischen oder tiefgekühlten Früchten werden diese zunächst im gefrorenen Zustand zerkleinert, 2,50 g in 200 mL Erlenmeyerkolben abgewogen und mit 100 mL eines Extraktionsmittelgemisches aus Methanol/Ameisensäure/Wasser, 70:2:28 (v/v/v) für 2 h unter Rühren bei Raumtemperatur extrahiert. Anschließend wird die Probenlösung filtriert und 1:2 mit Nanopure® Wasser verdünnt für die Bestimmung eingesetzt.

Säfte werden je nach erwarteter antioxidativer Aktivität 1:5 bis 1:50 (v/v) mit Nanopure® Wasser verdünnt.

- ABTS^{•+}-Stammlösung: 38,43 mg ABTS und 6,90 mg Kaliumperoxodisulfat ($K_2S_2O_8$) werden in einen mit Aluminiumfolie gegen Licht abgeschirmten Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 10 mL Nanopure® Wasser versetzt. Diese Lösung wird anschließend mindestens 12 Std. zur Bildung des ABTS^{•+}-Radikals bei Raumtemperatur gelagert.

- ABTS^{•+}-Arbeitslösung: Die ABTS^{•+}-Stammlösung wird so weit mit Ethanol (p.a.) verdünnt, bis sie eine Extinktion zwischen 0,7 und 0,9 bei 734 nm aufweist.

- Trolox®-Stammlösung: 26,76 mg Trolox® werden in einen 10 mL Messkolben eingewogen und mit Ethanol bis zur Marke aufgefüllt.
- Trolox®-Standardlösungen: Zur Erstellung einer Kalibrierreihe werden jeweils 250 µL, 500 µL, 750 µL, 1000 µL in einen 5 mL Messkolben pipettiert, mit Ethanol bis zur Marke aufgefüllt und so Standardlösungen in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,5 bis 2 mmol/L Trolox® erhalten.

b) Durchführung:

Es werden jeweils 1 mL ABTS^{•+}-Arbeitslösung in Semimikroküvetten pipettiert und die Extinktionen photometrisch bei 734 nm gemessen (E_1). Anschließend werden je 10 µL der Probelösungen, der Trolox®-Standardlösungen bzw. Ethanol (Blindwert) hinzugegeben und sofort durchmischt. Nach genau 6 min Reaktionszeit wird die Extinktion E_2 bei 734 nm bestimmt. Von den Proben werden mind. Doppelbestimmungen durchgeführt. Außerdem wird, um die Sicherheit der Ergebnisse zu gewährleisten, eine Probe mit bekannter antioxidativer Aktivität (Vitamin C) mitbestimmt.

c) Auswertung:

Durch Subtraktion der Extinktion E_2 von der Extinktion E_1 wird ΔE erhalten. Im Anschluss erfolgt die Subtraktion des ΔE -Blindwertes von den ΔE -Werten der Probe- bzw. der Standardlösungen. Die erhaltenen Werte der Standardlösungen werden gegen die Konzentrationen aufgetragen und durch lineare Regression eine Kalibriergerade erstellt, anhand derer die antioxidativen Aktivitäten der Probelösungen errechnet werden.

5.5.4.4 Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu

Die Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes erfolgt in Anlehnung an die Methode nach Singleton und Rossi (1965).

a) Herstellen der Lösungen:

- Probelösungen: Die Vorbereitung der Probelösungen erfolgt analog der in Kapitel 5.5.4.3 beschriebenen Probenvorbereitung zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität. Anschließend werden die Probenlösungen 1:10 mit Nanopure® Wasser verdünnt für die Bestimmung eingesetzt.
- Folin-Ciocalteu-Lösung: 1:10 Verdünnung des Folin-Ciocalteu Reagenz mit Nanopure® Wasser
- 7,5%ige wässrige Natriumcarbonat-Lösung (Na_2CO_3).
- Gallussäure-Stammlösung: 55,3 mg Gallussäure-Monohydrat werden in einen 100 mL Messkolben eingewogen und mit Nanopure® Wasser bis zur Marke aufgefüllt.
- Gallussäure-Standardlösungen: Es werden 1,2,3,4 und 5 mL der Gallussäure-Stammlösung jeweils in einen 50 mL Messkolben pipettiert und mit Nanopure® Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

b) Durchführung:

Es werden jeweils 200 µL der Proben- und Standardlösungen bzw. Nanopure® Wasser (Blindwert) in Semimikroküvetten pipettiert. Anschließend wird jeweils 1 mL der Folin-Ciocalteu-Lösung hinzu pipettiert und gut durchmischt. Nach 6 min erfolgt die Zugabe von 800 µL der 7,5%igen Na_2CO_3 -

Lösung. Nach dem Durchmischen werden die Küvetten für 2 Std. bei Raumtemperatur zwecks Reaktion gelagert, bevor die Extinktionen der Lösungen bei 760 nm photometrisch bestimmt werden.

c) Auswertung:

Von den Extinktionen der Probe- bzw. Standardlösungen wird die Extinktion des Blindwertes subtrahiert. Aus den so erhaltenen ΔE -Werten der Standardlösungen wird durch Auftragen gegen die Konzentration eine Kalibriergerade durch lineare Regression erstellt, anhand derer die Gesamtpolyphenolgehalte der Probelösungen errechnet werden.

5.5.5 Sonstige Methoden

5.5.5.1 Gravimetrische Bestimmung des Trockensubstanzgehaltes

Die Bestimmung des Trockensubstanzgehaltes frischer Heidelbeerproben erfolgte nach Matissek et al. (2010). Dazu wurden frische und behandelte Heidelbeeren im tiefgekühlten Zustand mit einem Pürierstab zerkleinert, eine definierte Menge von ca. 5-7 g der homogenen Heidelbeermasse abgewogen und mit 10-15 g Seesand in einer Aluminiumschale verrieben. Anschließend wurden die Proben, wie in der Literatur angegeben, durch Trocknen im Trockenschrank bei 103°C bis zur Massenkonzanz getrocknet. Die Berechnung des prozentualen Trockensubstanzgehaltes erfolgte nach der Formel:

$$T[\%] = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100$$

mit: m_1 = Leermasse von Aluminiumschale und getrocknetem Seesand [g]

m_2 = Masse von Aluminiumschale und getrocknetem Seesand & Probe vor der Trocknung [g]

m_3 = Masse von Aluminiumschale und getrocknetem Seesand & Probe nach der Trocknung [g]

$m_2 - m_1$ = Probeneinwaage; $m_3 - m_1$ = Probenauswaage

5.5.5.2 Bestimmung von Schwellenwert und Farbbeitrag nach dem Farbaktivitätskonzept nach Hofmann (1998)

a) Für die Bestimmung des Schwellenwertes von Anthocyanen werden diese in Mengen von 1 bis 2 mg in 5 mL Meßkolben eingewogen und durch Auffüllen der Messkolben mit McIlvaine-Puffer-Lösungen Stammlösungen der Anthocyane hergestellt. Dabei richtet sich der pH-Wert der Pufferlösungen nach dem jeweiligen pH-Werten des Saftes.

b) Zur Herstellung der gewünschten Pufferlösung wird der gewünschte pH-Wert in der unten dargestellten Tab. 5.5 ausgewählt. Der Schnittpunkt in der Tabelle gibt die Menge der Lösung B an, die in einem 100 mL Messkolben mit der Lösung A bis zur Marke aufgefüllt wird.

Lösung A: 0,1 mol Citronensäure-Lösung: 19,2 g Citronensäure ($C_6H_8O_7$) auf 1000 mL

Lösung B: 0,2 mol Dinatriumphosphat-Lösung: 28,4 g Na_2HPO_4 auf 1000 mL

Zur Herstellung einer Pufferlösung mit dem pH-Wert 3,5 werden beispielsweise 30,3 mL der Lösung B mit Lösung A auf 100 mL aufgefüllt.

Tab. 5.5: Herstellung von McIlvaine-Puffer-Lösungen mit pH-Werten zwischen 2,6 und 4,9

pH	,0	,1	,2	,3	,4	,5	,6	,7	,8	,9
2							10,8	13,2	15,6	18,1
3	20,6	22,6	24,7	26,6	28,5	30,3	32,2	33,9	35,5	37,1
4	38,6	40,0	41,4	42,7	44,0	45,4	46,7	48,0	49,3	50,4

c) Anschließend werden Verdünnungen dieser Lösungen (1:100, 1:200, 1:300...) ebenfalls mit der McIlvaine-Puffer-Lsg. hergestellt und durch mindestens 3 Probanden unabhängig voneinander die letzte noch farbige wahrnehmbare Verdünnung bestimmt. Zu diesem Zweck werden die verdünnten Lösungen abwechselnd mit reinen Pufferlösungen in Kunststoffküvetten gefüllt und in eine weiße Styroporschiene gesetzt, so dass die Probanden durch Draufsicht auf die Flüssigkeitsoberfläche die Proben beurteilen können. Nach der unabhängig voneinander gefällten Beurteilung der Probanden wird der Mittelwert aus den Konzentrationen der letzten noch als farbige beurteilten Verdünnungen gebildet und so der Verdünnungsfaktor VF_A und der Schwellenwert S_A des jeweiligen Anthocyans ermittelt.

$$S_A = \frac{Konz_A \left[\frac{mg}{L} \right]}{VF_A \left[\frac{mg}{L} \right]}$$

mit: $Konz_A$ = Konzentration des Anthocyans in der Stammlösung und VF_A = Verdünnungsfaktor der Anthocyanstammlösung der letzten noch farbigen Probe.

d) Für die Ermittlung der Farbaktivität FA_A und des prozentualen Farbbeitrages F_A der einzelnen Anthocyane in einem Saft müssen zunächst noch die Konzentrationen der jeweiligen Anthocyane in dem Saft mit Hilfe der im Kapitel 5.5.1 beschriebenen HPLC Methode ermittelt werden. Danach erfolgt die Berechnung der Farbaktivität FA_A (CAV = colour activity value) nach der Formel:

$$FA_A = \frac{Konz_S \left[\frac{mg}{L} \right]}{S_A \left[\frac{mg}{L} \right]}$$

mit: $Konz_S$ = Konzentration des jeweiligen Anthocyans in dem Saft.

Die Berechnung des prozentuellen Farbbeitrages F_A des einzelnen Anthocyans in Bezug auf den Gesamtfarbeindruck des Saftes erfolgt nach der Formel:

$$F_A = \frac{FA_A}{VF_S} \times 100$$

mit: VF_S = Verdünnungsfaktor des Saftes.

Für die Ermittlung des Verdünnungsfaktors von Säften VF_S wird wie unter Abschnitt c) beschrieben vorgegangen, indem die Säfte mit der entsprechenden Pufferlösung verdünnt werden und unabhängig voneinander durch mindestens drei Probanden die letzte noch als farbige wahrnehmbare Verdünnung ermittelt wird.

5.6 Physikalisch-chemische Charakterisierung neuer erstmals aus *Vaccinium myrtillus* isolierter Verbindungen

(2*S*,4*R*)-4-(β -D-Glucopyranosyloxy)-pentan-2-yl-(2*E*)-*p*-cumarat

Herkunft: *Vaccinium myrtillus* (Extrakt)

Summenformel: C₂₀H₂₈O₉

Molekülmasse: 412,17 g/mol

UV nach Anlage I (Kapitel 5.3.4.1)

und Methode I (Kapitel 5.3.4.2)

λ_{\max} = 311 und 295 nm

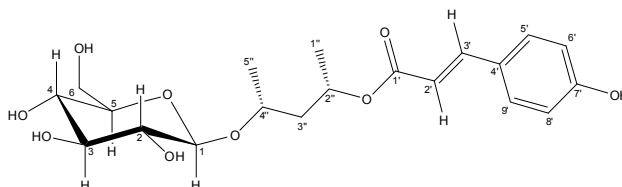
ESI-MS (negativer Modus): Pseudomolekülion m/z 411 [M-H]⁻;

Fragmente: m/z 163, 145, 119

t_R = 68,11 min nach Anlage I (Kapitel 5.3.4.1) und Methode I (Kapitel 5.3.4.2)

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) in ppm: 1.15 (d, 3H, J=6.2Hz, H5''abc), 1.25 (d, 3H, J=6.2Hz, H1''abc), 1.59 (ddd, 1H, J=5.3Hz, J=6.1Hz, J=13.9Hz, H3''a), 1.99 (m, 1H, H3''b), 3.08 (dd, 1H, J=7.9Hz, J=9.0Hz, H2), 3.18 (m, overlapped, 1H, H5), 3.22 (m, overlapped 1H, H4), 3.28 (t, 1H, J=8.9Hz, H3), 3.62 (dd, 1H, J=5.3Hz, J=11.8Hz, H6a), 3.80 (dd, 1H, J=2.1Hz, J=11.9Hz, H6b), 3.94 (m, 1H, H4''), 4.25 (d, 1H, J=7.8Hz, H1), 5.14 (m, H2''), 6.23 (d, 1H, J=15.9Hz, H2'), 6.74 (m, 2H, H6'/H8'), 7.39 (m, 2H, H5'/H9'), 7.52 (d, 1H, J=15.9Hz, H3')

¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) in ppm: 20,2 (C5''), 20,5 (C1''), 44,4 (C3''), 62,9 (C6), 70,2 (C2''), 71,6 (C4), 72,9 (C4''), 75,0 (C2), 77,8 (C5), 78,1 (C3), 102,1 (C1), 115,8 (C2'), 116,9 (C6'/C8'), 127,2 (C4'), 131,2 (C5'/C9'), 146,3 (C3'), 161,3 (C7'), 169,1 (C1')



10-*p-trans*-Cumaroyl-1*S*-monotropein (Vaccinosid)

Herkunft: *Vaccinium myrtillus* (Extrakt)

Summenformel: C₂₅H₂₈O₁₃

Molekülmasse: 536,15 g/mol

UV nach Anlage I (Kapitel 5.3.4.1)

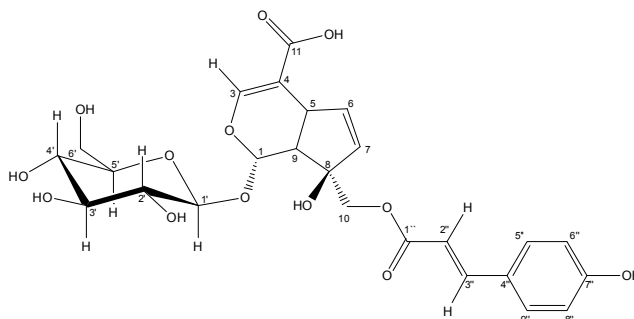
und Methode I (Kapitel 5.3.4.2)

λ_{\max} = 311 und 295 nm

ESI-MS (negativer Modus): Pseudomolekülion m/z 535 [M-H]⁻;

Fragmente: m/z 491, 371, 329, 311, 191, 163

t_R = 57,71 min nach Anlage I (Kapitel 5.3.4.1) und Methode I (Kapitel 5.3.4.2)



^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) bei ppm: 2.63 (dd, 1H, $J=2.3\text{Hz}$, $J=8.7\text{Hz}$, H9), 3.12 (dd, 1H, $J=8.0\text{Hz}$, $J=9.1\text{Hz}$, H2'), 3.21 (m (overlapped), 2H, H4'/H5'), 3.27 (t, 1H, $J=9.0\text{Hz}$, H3'), 3.50 (ddd, 1H, $J=1.7\text{Hz}$, $J=4.1\text{Hz}$, $J=8.7\text{Hz}$, H5), 3.55 (dd, 1H, $J=5.1\text{Hz}$, $J=12.0\text{Hz}$, H6a'), 3.75 (dd, 1H, $J=1.6\text{Hz}$, $J=11.9\text{Hz}$, H6b'), 4.11 (d, 1H, $J=11.1\text{Hz}$, H10a), 4.23 (d, 1H, $J=11.1\text{Hz}$, H10b), 4.58 (d, 1H, $J=7.9\text{Hz}$, H1'), 5.61 (dd, 1H, $J=1.8\text{Hz}$, $J=5.7\text{Hz}$, H7), 5.62 (d, 1H, $J=2.3\text{Hz}$, H1), 6.18 (dd, 1H, $J=2.6\text{Hz}$, $J=5.7\text{Hz}$, H6), 6.28 (d, 1H, $J=15.9\text{Hz}$, H2''), 6.71 (m, 2H, H6''/H8''), 7.33 (d, 1H, $J=1.4\text{Hz}$, H3), 7.39 (m, 2H, H5''/H9''), 7.55 (d, 1H, $J=15.9\text{Hz}$, H3'')

^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) bei ppm: 39,1 (C5), 46,4 (C9), 62,5 (C6'), 70,0 (C10), 71,4 (C4'), 74,6 (C2'), 78,0 (C3'), 78,3 (C5'), 84,4 (C8), 94,7 (C1), 99,9 (C1'), 111,0 (C4), 114,9 (C2''), 116,9 (C6''/C8''), 127,2 (C4''), 131,4 (C5''/C9''), 133,1 (C7), 138,5 (C6), 147,1 (C3''), 152,5 (C3), 161,4 (C7''), 169,0 (C1''), 170,5 (C11)

2-O-(3,4,5-Trihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxyphenyllessigsäure (ein Depsid)

Herkunft: *Vaccinium myrtillus* (Extrakt)

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_9$

Molekülmasse: 336,05 g/mol

UV nach Anlage I (Kapitel 5.3.4.1)

und Methode I (Kapitel 5.3.4.2)

$\lambda_{\text{max}} = 279 \text{ nm}$

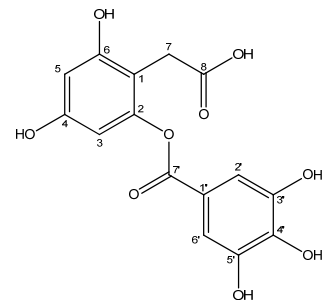
ESI-MS (negativer Modus): Pseudomolekulation m/z 335 $[\text{M}-\text{H}]^-$;

Fragmente: m/z 183, 169, 165, 139

$t_R = 20,20 \text{ min}$ nach Anlage I (Kapitel 5.3.4.1) und Methode I (Kapitel 5.3.4.2)

^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) bei ppm: 3.37 (s, 2H, H7), 6.06 (d, 1H, $J=2.4\text{Hz}$, H5), 6.18 (d, 1H, $J=2.3\text{Hz}$, H3), 7.10 (s, 2H, H2'/H6')

^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) bei ppm: 30,0 (C7), 101,2 (C3), 102,0 (C5), 107,5 (C1), 110,6 (C2'/C6'), 120,5 (C1'), 140,6 (C4'), 146,7 (C3'/C5'), 152,5 (C2), 158,5 (C4/C6), 166,6 (C7'), 175,9 (C8)



5.7 Physikalisch-chemische Charakterisierung isolierter Anthocyane

Cyanidin-3-O- β -D-glucopyranosid (Cyanidin-3-glucosid)

Herkunft: frische Brombeeren

Summenformel: $C_{21}H_{21}O_{11}^+$

Molekülmasse: 449,38 g/mol

UV nach Anlage I (Kapitel 5.3.4.1)

und Methode I (Kapitel 5.3.4.2)

λ_{\max} = 279 und 515 nm

molarer Adsorptionskoeffizient ϵ = 26 650

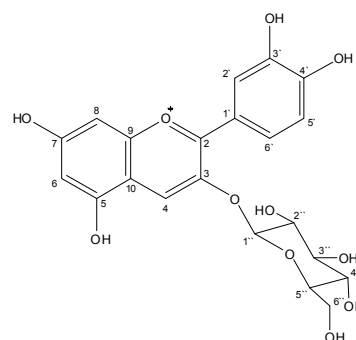
ESI-MS (positiver Modus):

Pseudomolekülion m/z 449 $[M+H]^+$; Fragmente: m/z 287 $[M-\text{Glucose}]^+$

t_R = 31,9 min nach Anlage I (Kapitel 5.3.4.1) und Methode I (Kapitel 5.3.4.2)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TFA}$ (d_1) 19:1 (v/v), ppm): δ = 3.44 (dd, 1H, $J=9,3\text{Hz}$, $J=9,4\text{Hz}$, $\text{H4}''$), 3.56 (d, 1H, $J=9,1\text{Hz}$, $\text{H3}''$), 3.55 (ddd, 1H, $J=2,3\text{Hz}$, $J=6,1\text{Hz}$, $J=9,0\text{Hz}$, $\text{H5}''$), 3.67 (dd, 1H, $J=7,8\text{Hz}$, $J=9,1\text{Hz}$, $\text{H2}''$), 3.72 (dd, 1H, $J=6,1\text{Hz}$, $J=12,1\text{Hz}$, $\text{H6b}''$), 3.92 (dd, 1H, $J=2,1\text{Hz}$, $J=12,1\text{Hz}$, $\text{H6a}''$), 5.29 (d, 1H, $J=7,8\text{Hz}$, $\text{H1}''$), 6.65 (d, 1H, $J=2,0\text{Hz}$, H6), 6.90 (dd, 1H, $J=0,8\text{Hz}$, $J=2,0\text{Hz}$, H8), 7.01 (d, 1H, $J=8,7\text{Hz}$, $\text{H5}'$), 8.05 (d, 1H, $J=2,3\text{Hz}$, $\text{H2}'$), 8.26 (dd, 1H, $J=2,3\text{Hz}$, $J=8,7\text{Hz}$, $\text{H6}'$), 9.03 (s, 1H, H4)

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz $\text{CD}_3\text{OD/TFA}$ (d_1) 19:1 (v/v), ppm): δ = 62.4 ($\text{C6}''$), 71.1 ($\text{C4}''$), 74,8 ($\text{C2}''$), 78.2 ($\text{C3}''$), 78.8 ($\text{C5}''$), 95.3 (C8), 103.4 (C6), 103.9 ($\text{C1}''$), 113.4 (C10), 117.4 ($\text{C5}'$), 118.5 ($\text{C2}'$), 121.3 ($\text{C1}'$), 128.3 ($\text{C6}'$), 137,1 (C4), 145,7 (C3), 147.4 ($\text{C3}'$), 155,8 ($\text{C4}'$), 157.8 (C9), 159.3 (C5), 164.5 (C2), 170.5 (C7)



Cyanidin-3,5-O- β -D-di-glucopyranosid (Cyanidin-3,5-diglucosid)

Herkunft: frische Granatäpfel

Summenformel: $C_{27}H_{31}O_{16}^+$

Molekülmasse: 611,54 g/mol

UV nach Anlage I (Kapitel 5.3.4.1)

und Methode I (Kapitel 5.3.4.2)

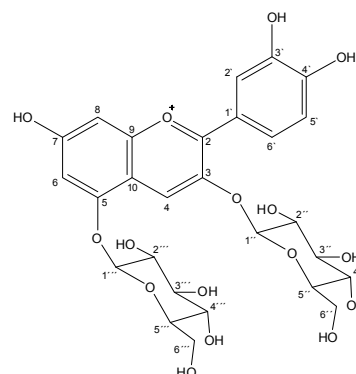
λ_{\max} = 271 und 515 nm

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion m/z 611 $[M+H]^+$;

Fragmente: m/z 449 $[M-\text{Glucose}]^+$; m/z 287 $[M-\text{Glucose-Glucose}]^+$

t_R = 24,39 min nach Anlage I (Kapitel 5.3.4.1) und Methode I (Kapitel 5.3.4.2)

$^1\text{H-NMR}$: siehe (Lee et al., 2011)



Cyanidin-3-O-[β-D-xylopyranosyl-(1'''→2'')- β-D-glucopyranosid] (Cyanidin-3-sambubiosid)

Herkunft: Hibiskus (Extrakt)

Summenformel: $C_{26}H_{29}O_{15}^{+}$

Molekülmasse: 581,51 g/mol

UV nach Anlage I (Kapitel 5.3.4.1)

und Methode I (Kapitel 5.3.4.2)

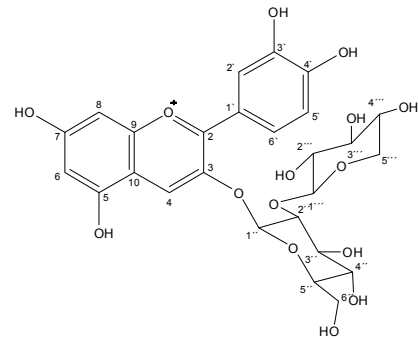
 $\lambda_{\max} = 275$ und 515 nm

ESI-MS (positiver Modus):

Pseudomolekülion m/z 581 $[M+H]^{+}$;Fragmente: m/z 287 $[M\text{-Glucose-Xylose}]^{+}$ $t_R = 34,8$ min nach Anlage I (Kapitel 5.3.4.1) und Methode II (Kapitel 5.3.4.2)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TFA}$ (d_1) 19:1 (v/v), ppm): $\delta = 3.11$ (1H, dd, $J=11.5\text{Hz}$, $J=10.6\text{Hz}$, $\text{H5}'''a$), 3.24 (1H, dd, $J=9.1\text{Hz}$, $J=7.8\text{Hz}$, $\text{H2}'''$), $3.30\text{-}3.38$ (1H, m, $\text{H3}'''$), 3.48 (1H, ddd, $J=10.4\text{Hz}$, $J=8.9\text{Hz}$, $J=5.4\text{Hz}$, $\text{H4}'''$), 3.58 (1H, dd, $J=9.2\text{Hz}$, $J=9.7\text{Hz}$, $\text{H4}''$), 3.66 (1H, ddd, $J=2.2\text{Hz}$, $J=5.7\text{Hz}$, $J=9.7\text{Hz}$, $\text{H5}''$), 3.75 (1H, dd, $J=5.4\text{Hz}$, $J=11.6\text{Hz}$, $\text{H5}'''b$), 3.80 (1H, dd, $J=5.7\text{Hz}$, $J=12.3\text{Hz}$, $\text{H6}''a$), 3.85 (1H, t, $J=9.1\text{Hz}$, $\text{H3}''$), 3.98 (1H, dd, $J=12.4\text{Hz}$, $J=2.3\text{Hz}$, $\text{H6}''b$), 4.01 (1H, dd, $J=9.0\text{Hz}$, $J=7.7\text{Hz}$, $\text{H2}''$), 4.82 (1H, d, $J=7.7\text{Hz}$, $\text{H1}'''$), 5.46 (1H, d, $J=7.6\text{Hz}$, $\text{H1}''$), 6.67 (1H, d, $J=2.0\text{Hz}$, H6), 6.87 (1H, d, $J=2.0\text{Hz}$, H8), 6.99 (1H, d, $J=8.7\text{Hz}$, $\text{H5}'$), 7.89 (1H, d, $J=2.3\text{Hz}$, $\text{H2}'$), 8.22 (1H, dd, $J=2.4\text{Hz}$, $J=8.7\text{Hz}$, $\text{H6}'$), 8.90 (1H, s, H4)

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz $\text{CD}_3\text{OD/TFA}$ (d_1) 19:1 (v/v), ppm): $\delta = 61.9$ ($\text{C6}''$), 66.9 ($\text{C5}'''$), 70.4 ($\text{C4}''$), 70.7 ($\text{C4}'''$), 75.5 ($\text{C2}'''$), 77.6 ($\text{C5}''$), 77.9 ($\text{C3}''$), 78.4 ($\text{C3}'''$), 81.4 ($\text{C2}''$), 94.9 (C8), 101.2 ($\text{C1}''$), 103.3 (C6), 105.4 ($\text{C1}'''$), 112.9 (C10), 117.2 ($\text{C5}'$), 118.2 ($\text{C2}'$), 120.9 ($\text{C1}'$), 128.5 ($\text{C6}'$), 135.6 (C4), 145.0 (C3), 147.2 ($\text{C3}'$), 155.8 ($\text{C4}'$), 157.2 (C9), 158.9 (C5), 164.4 (C2), 170.2 (C7)

**Delphinidin-3,5-O-β-D-di-glucopyranosid (Delphinidin-3,5-diglucosid)**

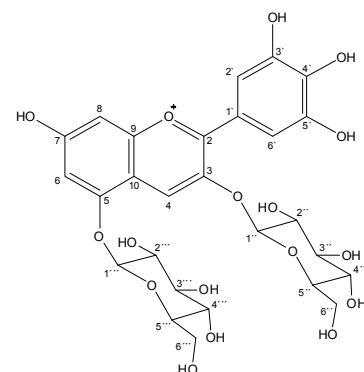
Herkunft: frische Granatäpfel

Summenformel: $C_{27}H_{31}O_{17}^{+}$

Molekülmasse: 627,52 g/mol

UV nach Anlage I (Kapitel 5.3.4.1)

und Methode I (Kapitel 5.3.4.2)

 $\lambda_{\max} = 275$ und 519 nmESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion m/z 627 $[M+H]^{+}$;Fragmente: m/z 465 $[M\text{-Glucose}]^{+}$; m/z 303 $[M\text{-Glucose-Glucose}]^{+}$ $t_R = 20,09$ min nach Anlage I (Kapitel 5.3.4.1) und Methode I (Kapitel 5.3.4.2) $^1\text{H-NMR}$: siehe (Nørbæk und Kondo, 1998)

Delphinidin-3-O-[β -D-xylopyranosyl-(1'''' \rightarrow 2'')- β -D-glucopyronisid] (Delphinidin-3-sambubiosid)

Herkunft: Hibiskus (Extrakt)

Summenformel: $C_{26}H_{29}O_{16}^{+}$

Molekülmasse: 597,50 g/mol

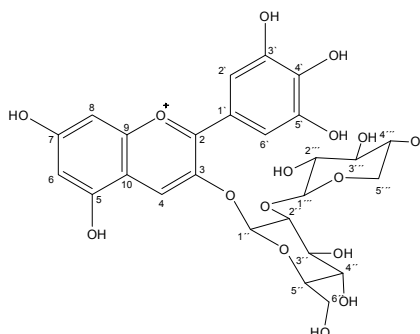
UV nach Anlage I (Kapitel 5.3.4.1)

und Methode I (Kapitel 5.3.4.2)

 $\lambda_{\max} = 275$ und 523 nmESI-MS (positiver Modus): PseudomolekÜlion m/z 597 $[M+H]^+$;Fragmente: m/z 303 $[M\text{-Glucose-Xylose}]^+$ $t_R = 19,8$ min nach Anlage I (Kapitel 5.3.4.1) und Methode II (Kapitel 5.3.4.2)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TFA}$ (d_1) 19:1 (v/v), ppm): $\delta = 2.98$ (1H, dd, $J=11.6\text{Hz}$, $J=10.4\text{Hz}$, $\text{H5}''''\text{a}$), 3.20 (1H, dd, $J=9.1\text{Hz}$, $J=7.7\text{Hz}$, $\text{H2}''''$), $3.29\text{-}3.34$ (1H, m, $\text{H3}''''$), 3.38 (1H, ddd, $J=10.3\text{Hz}$, $J=8.9\text{Hz}$, $J=5.4\text{Hz}$, $\text{H4}''''$), 3.54 (1H, dd, $J=9.2\text{Hz}$, $J=9.7\text{Hz}$, $\text{H4}''$), 3.60 (1H, dd, $J=5.2\text{Hz}$, $J=11.5\text{Hz}$, $\text{H5}''''\text{b}$), 3.62 (1H, ddd, $J=2.5\text{Hz}$, $J=5.7\text{Hz}$, $J=9.8\text{Hz}$, $\text{H5}''$), 3.76 (1H, dd, $J=5.7\text{Hz}$, $J=12.2\text{Hz}$, $\text{H6}''\text{a}$), 3.80 (1H, t, $J=9.1\text{Hz}$, $\text{H3}''$), 3.94 (1H, dd, $J=12.3\text{Hz}$, $J=2.3\text{Hz}$, $\text{H6}''\text{b}$), 4.01 (1H, dd, $J=9.0\text{Hz}$, $J=7.6\text{Hz}$, $\text{H2}''$), 4.71 (1H, d, $J=7.7\text{Hz}$, $\text{H1}''''$), 5.48 (1H, d, $J=7.6\text{Hz}$, $\text{H1}''$), 6.66 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, H6), 6.86 (1H, d, $J=2.0\text{Hz}$, H8), 7.75 (2H, s, $\text{H2}'$, $\text{H6}'$), 8.89 (1H, s, H4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz $\text{CD}_3\text{OD/TFA}$ (d_1) 19:1 (v/v), ppm): $\delta = 61.9$ ($\text{C6}''$), 66.8 ($\text{C5}''''$), 70.4 ($\text{C4}''$), 70.6 ($\text{C4}''''$), 75.5 ($\text{C2}''''$), 77.6 ($\text{C5}''$), 77.7 ($\text{C3}''$), 78.4 ($\text{C3}''''$), 81.4 ($\text{C2}''$), 94.9 (C8), 101.3 ($\text{C1}''$), 103.1 (C6), 105.9 ($\text{C1}''''$), 112.5 (C10), 112.7 ($\text{C2}'$, $\text{C6}'$), 120.0 ($\text{C1}'$), 135.0 (C4), 144.7 ($\text{C4}'$), 145.5 (C3), 147.6 ($\text{C3}'$, $\text{C5}'$), 157.4 (C9), 158.6 (C5), 164.0 (C2), 170.2 (C7)

**Pelargonidin-3,5-O- β -D-di-glucopyranosid (Pelargonidin-3,5-diglucosid)**

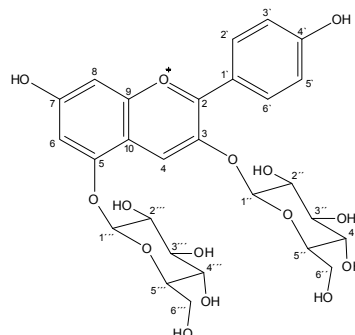
Herkunft: frische GranatÄpfel

Summenformel: $C_{27}H_{31}O_{15}^{+}$

Molekülmasse: 595,53 g/mol

UV nach Anlage I (Kapitel 5.3.4.1)

und Methode I (Kapitel 5.3.4.2)

 $\lambda_{\max} = 279$ und 499 nmESI-MS (positiver Modus): PseudomolekÜlion m/z 595 $[M+H]^+$;Fragmente: m/z 433 $[M\text{-Glucose}]^+$; m/z 271 $[M\text{-Glucose-Glucose}]^+$ $t_R = 28,4$ min nach Anlage I (Kapitel 5.3.4.1) und Methode I (Kapitel 5.3.4.2) $^1\text{H-NMR}$: siehe (Lee et al., 2011)

6 Literatur

- Adegunloye, B. J., J. O. Omoniyi, O. A. Owolabi, O. P. Ajagbonna, O. A. Sofola und H. A. Coker (1996). "Mechanisms of the blood pressure lowering effect of the calyx extract of *Hibiscus sabdariffa* in rats." *Afri J Med Med Sci* **25** (3): 235-238.
- Agarwal, R. (2005). "Smoking, oxidative stress and inflammation: Impact on resting energy expenditure in diabetic nephropathy." *BMC Nephrology* **6** (1): 13.
- Al-Kahtani, H. A. und B. H. Hassan (1990). "Spray drying of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract." *J Food Sci* **55** (4): 1073-1076.
- Alighourchi, H., M. Barzegar und S. Abbasi (2008). "Anthocyanins characterization of 15 Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their variation after cold storage and pasteurization." *Eur Food Res Technol* **227** (3): 881-887.
- Amasheh, M., J. Luettig, S. Amasheh, M. Zeitz, M. Fromm und J.-D. Schulzke (2012). "Effects of quercetin studied in colonic HT-29/B6 cells and rat intestine in vitro." *Ann N Y Acad Sci* **1258** (1): 100-107.
- Ames, B. N., M. K. Shigenaga und T. M. Hagen (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." *Proc Nat Acad Sci U S A* **90** (17): 7915-7922.
- Asen, S., R. N. Stewart und K. H. Norris (1972). "Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color." *Phytochemistry* **11** (3): 1139-1144.
- Avila, M. A., J. A. Velasco, J. Cansado und V. Notario (1994). "Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468." *Cancer Res* **54** (9): 2424-2428.
- Aviram, M., L. Dornfeld, M. Rosenblat, N. Volkova, M. Kaplan, R. Coleman, T. Hayek, D. Presser und B. Fuhrman (2000). "Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice." *Am J Clin Nutr* **71** (5): 1062-1076.
- Ayatollahi, A. M., M. Ghanadian, S. Afsharypour, O. M. Abdella, M. Mirzai und G. Askari (2011). "Pentacyclic triterpenes in *Euphorbia microsciadia* with their T-cell proliferation activity." *Iranian J Pharm Res* **10** (2): 287-294.
- Azar, M., E. Verette und S. Brun (1987). "Identification of some phenolic compounds in bilberry juice *Vaccinium myrtillus*." *J Food Sci* **52** (5): 1255-1257.
- Bayer, E., H. Egeter, A. Fink, K. Nether und K. Wegmann (1966). "Komplexbildung und Blütenfarben." *Angew Chem* **78** (18-19): 834-841.
- Belitz, H. D., P. Schieberle und W. Grosch (2008). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, Springer.
- Berliner, J. A. und J. W. Heinecke (1996). "The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis." *Free Radic Biol Med* **20** (5): 707-727.
- Boots, A. W., L. C. Wilms, E. L. Swennen, J. C. Kleinjans, A. Bast und G. R. Haenen (2008). "In vitro and ex vivo anti-inflammatory activity of quercetin in healthy volunteers." *Nutrition* **24** (7-8): 703-710.
- Bors, W., W. Heller, C. Michel und M. Saran (1990). "Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies." *Methods Enzymol* **186**: 343-355.
- Boulton, R. (2001). "The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review." *Am J Enol Vitic* **52** (2): 67-87.

- Bridle, P. und C. F. Timberlake (1997). "Anthocyanins as natural food colours – selected aspects." *Food Chem* **58** (1–2): 103-109.
- Brouillard, R., S. Chassaing, G. Isorez, M. Kueny-Stotz und P. Figueiredo (2010). "The visible flavonoids or anthocyanins: From research to applications." In *Recent Advances in Polyphenol Research*, Volume 2 (eds C. Santos-Buelga, M. T. Escribano-Bailon und V. Lattanzio), Wiley-Blackwell, Oxford, ch 1, 1-22.
- Brownmiller, C., L. R. Howard und R. L. Prior (2008). "Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products." *J Food Sci* **73** (5): H72-79.
- Burda, S. und W. Oleszek (2001). "Antioxidant and antiradical activities of flavonoids." *J Agric Food Chem* **49** (6): 2774-2779.
- Cao, G., E. Sofic und R. L. Prior (1997). "Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships." *Free Radic Biol Med* **22** (5): 749-760.
- Cavalcanti, R. N., D. T. Santos und M. A. A. Meireles (2011). "Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems – An overview." *Food Res Int* **44** (2): 499-509.
- Chaudhuri, R. K., F. Ü. Afifi-Yazar, O. Sticher und T. Winkler (1980). "¹³C NMR spectroscopy of naturally occurring iridoid glucosides and their acylated derivatives." *Tetrahedron* **36** (16): 2317-2326.
- Choi, J., K. T. Lee, M. Y. Choi, J. H. Nam, H. J. Jung, S. K. Park und H. J. Park (2005). "Antinociceptive anti-inflammatory effect of Monotropein isolated from the root of *Morinda officinalis*." *Biol Pharm Bull* **28** (10): 1915-1918.
- Chung, S. G., B. Z. Ahn und P. Pachaly (1980). "Andromedosid, ein neues Iridoidglykosid aus *Andromeda polifolia* L." *Archiv Pharm* **313** (8): 702-708.
- Cisowska, A., D. Wojnicz und A. B. Hendrich (2011). "Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin." *Nat Prod Commun* **6** (1): 149-156.
- Clifford, M. N. (2000). "Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden." *J Sci Food Agric* **80** (7): 1063-1072.
- Clifford, M. N., K. L. Johnston, S. Knight und N. Kuhnert (2003). "Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids." *J Agric Food Chem* **51** (10): 2900-2911.
- Cobbold, C. A., J. A. Sherratt und S. R. Maxwell (2002). "Lipoprotein oxidation and its significance for atherosclerosis: a mathematical approach." *Bull Math Biol* **64** (1): 65-95.
- Conway, W. D. (1991). "Counter-current chromatography." *J Chromatogr A* **538** (1): 27-35.
- Crozier, A., I. B. Jaganath und M. N. Clifford (2009). "Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health." *Nat Prod Rep* **26** (8): 1001-1043.
- Dangles, O., N. Saito und R. Brouillard (1993). "Anthocyanin intramolecular copigment effect." *Phytochemistry* **34** (1): 119-124.
- Darren, C., S. Michael, B. David, W. Peter, P. S. William, J. G. Andreas und H. M. Timothy (2006). "Effect of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the Apc^{Min} mouse model of intestinal carcinogenesis - Relationship with tissue anthocyanin levels." *Int J Cancer* **119** (9): 2213-2220.
- de Rivera, C., B. Shukitt-Hale, J. A. Joseph und J. R. Mendelson (2006). "The effects of antioxidants in the senescent auditory cortex." *Neurobiol Aging* **27** (7): 1035-1044.
- Degenhardt, A., H. Knapp und P. Winterhalter (2000). "Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity." *J Agric Food Chem* **48** (2): 338-343.

- Demmer, W. und D. Nussbaumer (1999). "Large-scale membrane adsorbers." *J Chromatogr A* **852** (1): 73-81.
- Diaz, M. N., B. Frei, J. A. Vita und J. F. Keaney, Jr. (1997). "Antioxidants and atherosclerotic heart disease." *N Engl J Med* **337** (6): 408-416.
- Dixon, R. A., D. Y. Xie und S. B. Sharma (2005). "Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research?" *New Phytol* **165** (1): 9-28.
- Du, C. T., P. L. Wang und F. J. Francis (1975). "Anthocyanins of pomegranate, *Punica granatum*." *Journal of Food Science* **40** (2): 417-418.
- Du, Q. und Y. Ito (2003). "Slow rotary countercurrent chromatography." *J Liquid Chromatogr Relat Technol* **26** (11): 1827-1838.
- Du, Q., G. Jerz, Y. He, L. Li, Y. Xu, Q. Zhang, Q. Zheng, P. Winterhalter und Y. Ito (2005). "Semi-industrial isolation of salicin and amygdalin from plant extracts using slow rotary countercurrent chromatography." *J Chromatogr A* **1074** (1-2): 43-46.
- Du, Q., P. Wu und Y. Ito (2000). "Low-speed rotary countercurrent chromatography using a convoluted multilayer helical tube for industrial separation." *Anal Chem* **72** (14): 3363-3365.
- Duffy, K. B., E. L. Spangler, B. D. Devan, Z. Guo, J. L. Bowker, A. M. Janas, A. Hagepanos, R. K. Minor, R. DeCabo, P. R. Mouton, B. Shukitt-Hale, J. A. Joseph und D. K. Ingram (2008). "A blueberry-enriched diet provides cellular protection against oxidative stress and reduces a kainate-induced learning impairment in rats." *Neurobiol Aging* **29** (11): 1680-1689.
- Ekstrom, A. M., M. Serafini, O. Nyren, A. Wolk, C. Bosetti und R. Bellocco (2011). "Dietary quercetin intake and risk of gastric cancer: results from a population-based study in Sweden." *Ann Oncol* **22** (2): 438-443.
- Esatbeyoglu, T. (2011). *Analyse wertgebender Inhaltsstoffe von Aronia melanocarpa sowie Charakterisierung und Isolierung von Proanthocyanidinen*. Dissertation TU Braunschweig, Cuvillier Verlag Göttingen.
- Fabre, N., I. Rustan, E. de Hoffmann und J. Quetin-Leclercq (2001). "Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry." *J Am Soc Mass Spectrom* **12** (6): 707-715.
- Faria, A., J. Oliveira, P. Neves, P. Gameiro, C. Santos-Buelga, V. de Freitas und N. Mateus (2005). "Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts." *J Agric Food Chem* **53** (17): 6896-6902.
- FEI, Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (2011). "Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen." *ISBN: 978-3-925032-49-3*.
- Ferrali, M., C. Signorini, B. Caciotti, L. Sugherini, L. Ciccoli, D. Giachetti und M. Comporti (1997). "Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity." *FEBS Lett* **416** (2): 123-129.
- Fischer-Frühholz, S. (2004). "Membranadsorber. Schneller am Ziel in der Biochromatographie." *GIT Labor-Fachzeitschrift* **48** (9): 2-4.
- Fleschhut, J., F. Kratzer, G. Rechkemmer und S. E. Kulling (2006). "Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro." *Eur J Nutr* **45** (1): 7-18.
- Folin, O. und V. Ciocalteu (1927). "On tyrosine and tryptophane determinations in proteins." *J Biol Chem* **73** (2): 627-650.
- Fossen, T., L. Cabrita und O. M. Andersen (1998). "Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region." *Food Chem* **63** (4): 435-440.

- Fukumoto, L. R. und G. Mazza (2000). "Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds." *J Agric Food Chem* **48** (8): 3597-3604.
- Galli, R. L., B. Shukitt-Hale, K. A. Youdim und J. A. Joseph (2002). "Fruit polyphenolics and brain aging." *Ann N Y Acad Sci* **959** (1): 128-132.
- Gao, L. und G. Mazza (1994). "Quantitation and distribution of simple and acylated anthocyanins and other phenolics in blueberries." *J Food Sci* **59** (5): 1057-1059.
- Gebauer, K. H., J. Thömmes und M. R. Kula (1997). "Breakthrough performance of high-capacity membrane adsorbers in protein chromatography." *Chem Eng Sci* **52** (3): 405-419.
- Ghosh, D. und T. Konishi (2007). "Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function." *Asia Pac J Clin Nutr* **16** (2): 200-208.
- Ghosh, R. (2002). "Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges." *J Chromatogr A* **952** (1-2): 13-27.
- Gianazza, E. und P. Arnaud (1982). "A general method for fractionation of plasma proteins. Dye-ligand affinity chromatography on immobilized Cibacron blue F3-GA." *Biochem J* **201** (1): 129-136.
- Gil, M. I., F. A. Tomás-Bárberan, B. Hess-Pierce, D. M. Holcroft und A. A. Kader (2000). "Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing." *J Agric Food Chem* **48** (10): 4581-4589.
- Giusti, M. M. und R. E. Wrolstad (2003). "Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems." *Biochem Eng J* **14** (3): 217-225.
- Goto, T. und T. Kondo (1991). "Struktur und molekulare Stapelung von Anthocyanen – Variation der Blütenfarben." *Angew Chem* **103** (1): 17-33.
- Haji Faraji, M. und A. H. Haji Tarkhani (1999). "The effect of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on essential hypertension." *J Ethnopharmacol* **65** (3): 231-236.
- Häkkinen, S., M. Heinonen, S. Kärenlampi, H. Mykkänen, J. Ruuskanen und R. Törrönen (1999). "Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries." *Food Res Int* **32** (5): 345-353.
- Halliwell, B. (2006). "Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?" *J Neurochem* **97** (6): 1634-1658.
- Halliwell, B. und J. Gutteridge (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, 4th edition.
- He, J. und M. M. Giusti (2010). "Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties." *Annu Rev Food Sci Technol* **1**: 163-187.
- Heinecke, J. W. (1998). "Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis." *Atherosclerosis* **141** (1): 1-15.
- Heinonen, I. M., A. S. Meyer und E. N. Frankel (1998). "Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation." *J Agric Food Chem* **46** (10): 4107-4112.
- Heinonen, M. (2007). "Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics – a Finnish perspective." *Mol Nutr Food Res* **51** (6): 684-691.
- Henke, H. (1994). "Präparative Gelchromatographie an Sephadex LH-20". Hüthig, Heidelberg: 26-48.

- Herrmann, K. M. (1995). "The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds." *Plant Cell* **7** (7): 907-919.
- Hider, R. C., Z. D. Liu und H. H. Khodr (2001). "Metal chelation of polyphenols." *Methods Enzymol* **335**: 190-203.
- Hillebrand, S. (2004). *Analytik von Polyphenolen in Buntsäften im Hinblick auf Saftqualität, Farbe und antioxidative Aktivität*. Dissertation TU Braunschweig, Cuvillier Verlag Göttingen.
- Hillenbrand, M., J. Zapp und H. Becker (2004). "Deposides from the Petals of *Papaver rhoeas*." *Planta Med* **70** (4): 380-382.
- Hofmann, T. (1998). "Studies on the influence of the solvent on the contribution of single maillard reaction products to the total color of browned pentose/alanine solutions – A quantitative correlation using the Color Activity Concept." *J Agric Food Chem* **46** (10): 3912-3917.
- Hokkanen, J., S. Mattila, L. Jaakola, A. M. Pirttilä und A. Tolonen (2009). "Identification of phenolic compounds from lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.), bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and hybrid bilberry (*Vaccinium x intermedium* Ruthe L.) leaves." *J Agric Food Chem* **57** (20): 9437-9447.
- Hoshino, T., U. Matsumoto und T. Goto (1981). "Self-association of some anthocyanins in neutral aqueous solution." *Phytochemistry* **20** (8): 1971-1976.
- Huang, D., B. Ou und R. L. Prior (2005). "The chemistry behind antioxidant capacity assays." *J Agric Food Chem* **53** (6): 1841-1856.
- Hwang, Y. P., J. H. Choi, H. J. Yun, E. H. Han, H. G. Kim, J. Y. Kim, B. H. Park, T. Khanal, J. M. Choi, Y. C. Chung und H. G. Jeong (2011). "Anthocyanins from purple sweet potato attenuate dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats by inducing Nrf2-mediated antioxidant enzymes and reducing COX-2 and iNOS expression." *Food Chem Toxicol* **49** (1): 93-99.
- Hybelbauerová, S., J. Sejbál, M. Dračinský, I. Rudovská und B. Koutek (2009). "Unusual p-coumarates from the stems of *Vaccinium myrtillus*." *Helv Chim Acta* **92** (12): 2795-2801.
- Ichiyangagi, T., Y. Shida, M. M. Rahman, Y. Hatano und T. Konishi (2006). "Bioavailability and tissue distribution of anthocyanins in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract in rats." *J Agric Food Chem* **54** (18): 6578-6587.
- Iriti, M. und F. Faoro (2009). "Bioactivity of grape chemicals for human health." *Nat Prod Commun* **4** (5): 611-634.
- Ito, Y. (1992). "Speculation on the mechanism of unilateral hydrodynamic distribution of two immiscible solvent phases in the rotating coil." *J Liq Chromatogr* **15** (15-16): 2639-2675.
- Ito, Y. (2005). "Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography." *J Chromatogr A* **1065** (2): 145-168.
- Ito, Y. und W. D. Conway (1986). "High-speed countercurrent chromatography." *C R C Crit Rev Anal Chem* **17** (1): 65-143.
- Ito, Y., M. Weinstein, I. Aoki, R. Harada, E. Kimura und K. Nunogaki (1966). "The Coil Planet Centrifuge." *Nature* **212** (5066): 985-987.
- Joseph, J. A., B. Shukitt-Hale und G. Casadesus (2005). "Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds." *Am J Clin Nutr* **81** (1): 313S-316.
- Kähkönen, M. P., J. Heinämäki, V. Ollilainen und M. Heinonen (2003). "Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities." *J Sci Food Agric* **83** (14): 1403-1411.

- Kalt, W., S. MacKinnon, J. McDonald, M. Vinqvist, C. Craft und A. Howell (2008). "Phenolics of *Vaccinium* berries and other fruit crops." *J Sci Food Agric* **88** (1): 68-76.
- Kalt, W., J. E. McDonald, R. D. Ricker und X. Lu (1999). "Anthocyanin content and profile within and among blueberry species." *Can J Plant Sci* **79** (4): 617-623.
- Kang, S. Y., N. P. Seeram, M. G. Nair und L. D. Bourquin (2003). "Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc^{Min} mice and reduce proliferation of human colon cancer cells." *Cancer Lett* **194** (1): 13-19.
- Katsube, N., K. Iwashita, T. Tsushida, K. Yamaki und M. Kobori (2003). "Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins." *J Agric Food Chem* **51** (1): 68-75.
- Kelm, M. (2003). "The L-arginine-nitric oxide pathway in hypertension." *Curr Hypertens Rep* **5** (1): 80-86.
- Klaubert, B. (1998). *Phytochemische Untersuchung der brasilianischen Arzneipflanzen Costus scaber (Costaceae) und Prevostea ferruginea (Convolvulaceae) – Isolierung und Strukturaufklärung der Inhaltsstoffe sowie die Synthese von Costerin, einem neuen natürlichen Cyclopentenon*. Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg.
- Knaup, B., A. Oehme, A. Valotis und P. Schreier (2009). "Anthocyanins as lipoxygenase inhibitors." *Mol Nutr Food Res* **53** (5): 617-624.
- Köhler, N. (2006). *Entwicklung und Anwendung leistungsfähiger präparativer gegenstromverteilungs-chromatographischer Trenntechniken*. Dissertation TU Braunschweig, Cuvillier Verlag Göttingen.
- Kraus, M. (2007). *Synthese von ¹⁴C-markierten Anthocyanidinen und Studien zur intestinalen Verfügbarkeit von Anthocyanen aus Heidelbeeren (*Vaccinium myrtillus* L.)*. Dissertation Universität Würzburg 2006.
- Kumar, K. C. und K. Muller (1999). "Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth." *J Nat Prod* **62** (6): 821-823.
- Lapidot, T., S. Harel, B. Akiri, R. Granit und J. Kanner (1999). "pH-Dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants." *J Agric Food Chem* **47** (1): 67-70.
- Lätti, A. K., K. R. Riihinen und L. Jaakola (2011). "Phenolic compounds in berries and flowers of a natural hybrid between bilberry and lingonberry (*Vaccinium x intermedium* Ruthe)." *Phytochemistry* **72** (8): 810-815.
- Lätti, A. K., K. R. Riihinen und P. S. Kainulainen (2008). "Analysis of anthocyanin variation in wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in Finland." *J Agric Food Chem* **56** (1): 190-196.
- Lawenda, B. D., K. M. Kelly, E. J. Ladas, S. M. Sagar, A. Vickers und J. B. Blumberg (2008). "Should supplemental antioxidant administration be avoided during chemotherapy and radiation therapy?" *J Nat Cancer Inst* **100** (11): 773-783.
- Lee, J., R. W. Durst und R. E. Wrolstad (2005). "Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study." *J AOAC Int* **88** (5): 1269-1278.
- Lee, J., C. Rennaker und R. E. Wrolstad (2008). "Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods." *Food Chem* **110** (3): 782-786.
- Lee, J. H., H.-J. Lee und M.-G. Choung (2011). "Anthocyanin compositions and biological activities from the red petals of Korean edible rose (*Rosa hybrida* cv. Noblered)." *Food Chemistry* **129** (2): 272-278.

- Macheix, J. J., A. Fleuriet und J. Billot (1990). *Fruit Phenolics*. CRC Press, Boca Raton.
- Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy und L. Jiménez (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability." *Am J Clin Nutr* **79** (5): 727-747.
- Markakis, P. und L. Jurd (1974). "Anthocyanins and their stability in foods." *C R C Crit Rev Food Technol* **4** (4): 437-456.
- Markovic, J. M. D., N. A. Petranovic und J. M. Jelisaveta (2000). "A spectrophotometric study of the Copigmentation of malvin with caffeic and ferulic acids." *J Agric Food Chem* **48** (11): 5530-5536.
- Mas, T., J. Susperregui, B. Berke, C. Cheze, S. Moreau, A. Nuhric und J. Vercauteren (2000). "DNA triplex stabilization property of natural anthocyanins." *Phytochemistry* **53** (6): 679-687.
- Matern, U. und B. Grimmig (1993). "Polyphenols in plant pathology." In *Polyphenolic Phenomena*, Scalbert, A. (ed.). Institut National de la Recherche Agronomique (INRA editions): 143-147.
- Matissek, R., G. Steiner und M. Fischer (2010). *Lebensmittelanalytik*. Springer.
- Matsumoto, H., Y. Nakamura, S. Tachibanaki, S. Kawamura und M. Hirayama (2003). "Stimulatory effect of cyanidin 3-glycosides on the regeneration of rhodopsin." *J Agric Food Chem* **51** (12): 3560-3563.
- Mazza, G. und R. Brouillard (1990). "The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions." *Phytochemistry* **29** (4): 1097-1102.
- Mazza, G., C. D. Kay, T. Cottrell und B. J. Holub (2002). "Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects." *J Agric Food Chem* **50** (26): 7731-7737.
- Mazza, G. und E. Miniati (1993). *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. CRC Press, Boca Raton.
- McGhie, T. K. und M. C. Walton (2007). "The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding." *Mol Nutr Food Res* **51** (6): 702-713.
- Miller, N. J., C. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan und A. Milner (1993). "A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates." *Clin Sci (Lond)* **84** (4): 407-412.
- Mitchell, J. A., M. G. Belvisi, P. Akarasereenont, R. A. Robbins, O. J. Kwon, J. Croxtall, P. J. Barnes und J. R. Vane (1994). "Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone." *Br J Pharmacol* **113** (3): 1008-1014.
- Moreira, R. F., L. C. Trugo, C. A. de Maria, A. G. Matos, S. M. Santos und J. M. Leite (2001). "Discrimination of Brazilian arabica green coffee samples by chlorogenic acid composition." *Arch Latinoam Nutr* **51** (1): 95-99.
- Neamati, N., H. Hong, A. Mazumder, S. Wang, S. Sunder, M. C. Nicklaus, G. W. Milne, B. Proksa und Y. Pommier (1997). "Deposides and depsidones as inhibitors of HIV-1 integrase: discovery of novel inhibitors through 3D database searching." *J Med Chem* **40** (6): 942-951.
- Netzel, M., G. Netzel, D. R. Kammerer, A. Schieber, R. Carle, L. Simons, I. Bitsch, R. Bitsch und I. Konczak (2007). "Cancer cell antiproliferation activity and metabolism of black carrot anthocyanins." *Innovative Food Sci Emerging Technol* **8** (3): 365-372.
- Nie, H. L. und L. M. Zhu (2007). "Adsorption of papain with Cibacron Blue F3GA carrying chitosan-coated nylon affinity membranes." *Int J Biol Macromol* **40** (3): 261-267.
- Nørbæk, R. und T. Kondo (1998). "Anthocyanins from flowers of *Crocus* (iridaceae)." *Phytochemistry* **47** (5): 861-864.

- Ohlrogge, K. und K. Ebert (2006). "Membranen. Grundlagen, Verfahren und industrielle Anwendungen." Wiley-VCH, Weinheim: 208-215.
- Olsson, M. E., C. S. Andersson, S. Oredsson, R. H. Berglund und K. E. Gustavsson (2006). "Antioxidant levels and inhibition of cancer cell proliferation in vitro by extracts from organically and conventionally cultivated strawberries." *J Agric Food Chem* **54** (4): 1248-1255.
- Ono, M., M. Koto, H. Komatsu, K. Igoshi, H. Kobayashi, Y. Ito und T. Nohara (2004). "Cytotoxic triterpenes and sterol from the fruit of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*)." *Food Sci Technol Res* **10** (1): 56-59.
- Ott, M., V. Gogvadze, S. Orrenius und B. Zhivotovsky (2007). "Mitochondria, oxidative stress and cell death." *Apoptosis* **12** (5): 913-922.
- Perez-Jimenez, J., V. Neveu, F. Vos und A. Scalbert (2010). "Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: an application of the phenol-explorer database." *J Agric Food Chem* **58** (8): 4959-4969.
- Perron, N. R. und J. L. Brumaghim (2009). "A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding." *Cell Biochem Biophys* **53** (2): 75-100.
- Plate, K., S. Beutel, H. Buchholz, W. Demmer, S. Fischer-Frühholz, O. Reif, R. Ulber und T. Scheper (2006). "Isolation of bovine lactoferrin, lactoperoxidase and enzymatically prepared lactoferricin from proteolytic digestion of bovine lactoferrin using adsorptive membrane chromatography." *J Chromatogr A* **1117** (1): 81-86.
- Prior, R. L., G. Cao, A. Martin, E. Sofic, J. McEwen, C. O'Brien, N. Lischner, M. Ehlenfeldt, W. Kalt, G. Krewer und C. M. Mainland (1998). "Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species." *J Agric Food Chem* **46** (7): 2686-2693.
- Quast, P. (2008). *Beitrag zur Charakterisierung anthocyanhaltiger Alterungsprodukte in Buntsäften*. Dissertation TU Braunschweig, Cuvillier Verlag Göttingen.
- Ramirez-Rodrigues, M. M., M. L. Plaza, A. Azeredo, M. O. Balaban und M. R. Marshall (2011). "Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from *Hibiscus sabdariffa*." *J Food Sci* **76** (3): C428-C435.
- Rasheed, Z., N. Akhtar, A. Anbazhagan, S. Ramamurthy, M. Shukla und T. Haqqi (2009). "Polyphenol-rich pomegranate fruit extract (POMx) suppresses PMACI-induced expression of pro-inflammatory cytokines by inhibiting the activation of MAP Kinases and NF- κ B in human KU812 cells." *J Inflamm* **6** (1): 1.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang und C. Rice-Evans (1999). "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." *Free Radic Biol Med* **26** (9-10): 1231-1237.
- Rein, M. J. und M. Heinonen (2004). "Stability and enhancement of berry juice color." *J Agric Food Chem* **52** (10): 3106-3114.
- Remy, S., H. Fulcrand, B. Labarbe, V. Cheynier und M. Moutounet (2000). "First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin – tannin reactions." *J Sci Food Agric* **80** (6): 745-751.
- Rentzsch, M. (2008). *Einfluss der Lagerung und Mikrooxygenierung auf ausgewählte Polyphenole in Rotwein*. Dissertation TU Braunschweig, Cuvillier Verlag Göttingen.
- Reynertson, K. A., A. M. Wallace, S. Adachi, R. R. Gil, H. Yang, M. J. Basile, J. D'Armiento, I. B. Weinstein und E. J. Kennelly (2006). "Bioactive depsides and anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*)." *J Nat Prod* **69** (8): 1228-1230.

- Rhodes, M. J. C. (1998). "Physiological roles of phenolic compounds in plants and their interactions with microorganisms and humans." In: Vercauteren, J. (Hrsg.); Chèze, C. (Hrsg.); Triaud, J. (Hrsg.): *Polyphenols 96, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)*: 13-30
- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller und G. Paganga (1996). "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids." *Free Radic Biol Med* **20** (7): 933-956.
- Riihinen, K., L. Jaakola, S. Kärenlampi und A. Hohtola (2008). "Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*)." *Food Chem* **110** (1): 156-160.
- Rodríguez-Medina, I. C., R. Beltrán-Debón, V. M. Molina, C. Alonso-Villaverde, J. Joven, J. A. Menéndez, A. Segura-Carretero und A. Fernández-Gutiérrez (2009). "Direct characterization of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* using HPLC with diode array detection coupled to ESI and ion trap MS." *J Sep Sci* **32** (20): 3441-3448.
- Ryter, S. W., H. P. Kim, A. Hoetzel, J. W. Park, K. Nakahira, X. Wang und A. M. Choi (2007). "Mechanisms of cell death in oxidative stress." *Antioxid Redox Signal* **9** (1): 49-89.
- Sadilova, E., R. Carle und F. C. Stintzing (2007). "Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity." *Mol Nutr Food Res* **51** (12): 1461-1471.
- Sakakibara, J., T. Kaiya und M. Yasue (1973). "Studies on the constituents of *Vaccinium bracteatum* Thunb. II. On the constituents of the flowers, particularly on the structure of vaccinoside, a new iridoid glycoside." *Yakugaku Zasshi* **93** (2): 164-170.
- Schlesier, K., M. Harwat, V. Bohm und R. Bitsch (2002). "Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods." *Free Radic Res* **36** (2): 177-187.
- Schreiber, H. D., A. M. Swink und T. D. Godsey (2010). "The chemical mechanism for Al³⁺ complexing with delphinidin: a model for the bluing of hydrangea sepals." *J Inorg Biochem* **104** (7): 732-739.
- Schwarz, M., S. Hillebrand, S. Habben, A. Degenhardt und P. Winterhalter (2003). "Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins." *Biochem Eng J* **14** (3): 179-189.
- Seeram, N. P., R. A. Momin, M. G. Nair und L. D. Bourquin (2001). "Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries." *Phytomedicine* **8** (5): 362-369.
- Senser, F., H. Scherz und S. W. Souci (2004). "*Der kleine Souci-Fachmann-Kraut: Lebensmitteltabelle für die Praxis*." Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Shan, B. E., M. X. Wang und R. Q. Li (2009). "Quercetin inhibit human SW480 colon cancer growth in association with inhibition of cyclin D₁ and survivin expression through Wnt/beta-catenin signaling pathway." *Cancer Invest* **27** (6): 604-612.
- Shiono, M., N. Matsugaki und K. Takeda (2008). "Structure of commelinin, a blue complex pigment from the blue flowers of *Commelina communis*." *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **84** (10): 452-456.
- Shukla, M., K. Gupta, Z. Rasheed, K. Khan und T. Haqqi (2008). "Bioavailable constituents/metabolites of pomegranate (*Punica granatum* L) preferentially inhibit COX2 activity ex vivo and IL-1beta-induced PGE₂ production in human chondrocytes in vitro." *J Inflamm* **5** (1): 1-10.
- Sies, H. (1991). "Role of reactive oxygen species in biological processes." *J Mol Med* **69** (21): 965-968.
- Sies, H. (1997). "Oxidative stress: oxidants and antioxidants." *Exp Physiol* **82** (2): 291-295.
- Sikorska, M. und I. Matlawska (2000). "Quercetin and its glycosides in the flowers of *Asclepias syriaca* L." *Acta Pol Pharm* **57** (4): 321-324.

- Silva, E. M., D. R. Pompeu, Y. Larondelle und H. Rogez (2007). "Optimisation of the adsorption of polyphenols from *Inga edulis* leaves on macroporous resins using an experimental design methodology." *Sep Purif Technol* **53** (3): 274-280.
- Singleton, V. L. und J. A. Rossi (1965). "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents." *Am J Enol Vitic* **16** (3): 144-158.
- Spormann, T. M., F. W. Albert, T. Rath, H. Dietrich, F. Will, J. P. Stockis, G. Eisenbrand und C. Janzowski (2008). "Anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative cell damage in an intervention study with patients on hemodialysis." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17** (12): 3372-3380.
- Stahl, E. (1967). "Dünnschichtchromatographie." Springer-Verlag, Berlin.
- Steinberg, D. (1997). "Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance." *J Biol Chem* **272** (34): 20963-20966.
- Sugihara, N., T. Arakawa, M. Ohnishi und K. Furuno (1999). "Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with α -linolenic acid." *Free Radic Biol Med* **27** (11-12): 1313-1323.
- Sukwattanasinit, T., J. Burana-Osot und U. Sotanaphun (2007). "Spectrophotometric method for quantitative determination of total anthocyanins and quality characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa*)." *Planta Med* **73** (EFirst): 1517-1522.
- Sutherland, I. A. (1987). "Countercurrent chromatography." *Lab. Practice* **36**: 37-38, 41-42.
- Szakiel, A. und A. Mroczek (2007). "Distribution of triterpene acids and their derivatives in organs of cowberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) plant." *Acta Biochim Pol* **54** (4): 733-740.
- Talavéra, S., C. Felgines, O. Texier, C. Besson, A. Mazur, J.-L. Lamaison und C. Rémésy (2006). "Bioavailability of a bilberry anthocyanin extract and its impact on plasma antioxidant capacity in rats." *J Sci Food Agric* **86** (1): 90-97.
- Tanner, G. J., K. T. Francki, S. Abrahams, J. M. Watson, P. J. Larkin und A. R. Ashton (2003). "Proanthocyanidin biosynthesis in plants. Purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA." *J Biol Chem* **278** (34): 31647-31656.
- Tseng, T. H., E. S. Kao, C. Y. Chu, F. P. Chou, H. W. Lin Wu und C. J. Wang (1997). "Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes." *Food Chem Toxicol* **35** (12): 1159-1164.
- Turner, A., S.-N. Chen, D. Nikolic, R. van Breemen, N. R. Farnsworth und G. F. Pauli (2007). "Coumaroyl Iridoids and a Depside from Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*)." *J Nat Prod* **70** (2): 253-258.
- Tzulker, R., I. Glazer, I. Bar-Ilan, D. Holland, M. Aviram und R. Amir (2007). "Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions." *J Agric Food Chem* **55** (23): 9559-9570.
- Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic und M. Mazur (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." *Chem Biol Interact* **160** (1): 1-40.
- Virtamo, J., P. Pietinen, J. K. Huttunen, P. Korhonen, N. Malila, M. J. Virtanen, D. Albanes, P. R. Taylor und P. Albert (2003). "Incidence of cancer and mortality following alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation: a postintervention follow-up." *JAMA* **290** (4): 476-485.
- Wang, B. C., R. He und Z. M. Li (2010). "The stability and antioxidant activity of anthocyanins from blueberry." *Food Technol Biotechnol* **48**: 42-49.

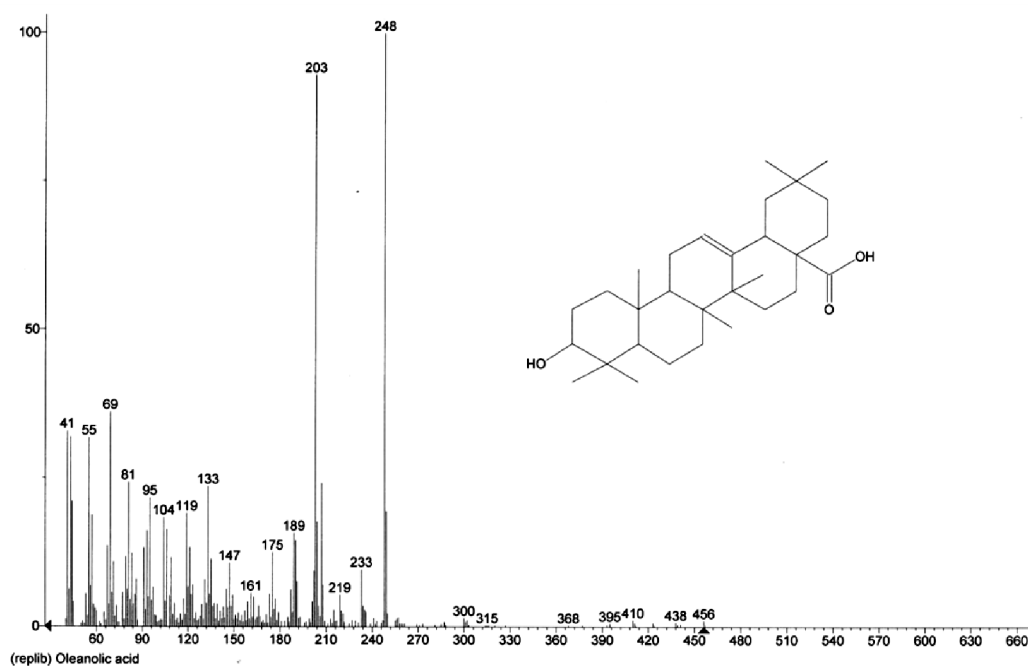
- Wang, C.-J., J.-M. Wang, W.-L. Lin, C.-Y. Chu, F.-P. Chou und T.-H. Tseng (2000). "Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats." *Food Chem Toxicol* **38** (5): 411-416.
- Wang, H., M. G. Nair, G. M. Strasburg, Y. C. Chang, A. M. Booren, J. I. Gray und D. L. DeWitt (1999). "Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries." *J Nat Prod* **62** (2): 294-296.
- Wang, L. S. und G. D. Stoner (2008). "Anthocyanins and their role in cancer prevention." *Cancer Lett* **269** (2): 281-290.
- Watzl, B. und G. Rechkemmer (2001). "Flavonoide." *Ernähr.-Umsch.* **48** (12): 499-503.
- Weber, F. (2012). *Untersuchung von polymeren Polyphenolen in Rotwein*. Dissertation TU Braunschweig, Cuvillier Verlag Göttingen.
- Wedepohl, K. und G. Schwedt (1987). "Zur Analytik von Kupfer/Flavonoid-Komplexen als Elementspezies in pflanzlichen Lebensmitteln." *Anal Chim Acta* **203** (1): 23-34.
- Willstätter, R. und E. H. Zollinger (1917). "XVI. Über die Farbstoffe der Weintraube und der Heidelbeere, II." *Justus Liebigs Ann Chem* **412** (2): 195-216.
- Wilska-Jeszka, J. und A. Korzuchowska (1996). "Anthocyanins and chlorogenic acid copigmentation - influence on the colour of strawberry and chokeberry juices." *Z Lebensm- Unters- Forsch A* **203** (1): 38-42.
- Wilson, M. A., B. Shukitt-Hale, W. Kalt, D. K. Ingram, J. A. Joseph und C. A. Wolkow (2006). "Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*." *Aging Cell* **5** (1): 59-68.
- Winterhalter, P. (2007). "Application of countercurrent chromatography (CCC) to the analysis of natural pigments." *Trends Food Sci Technol* **18** (10): 507-513.
- Wrolstad, R. E. (2004). "Anthocyanin pigments – bioactivity and coloring properties." *J Food Sci* **69** (5): C419-C425.
- Wu, D. und A. I. Cederbaum (2003). "Alcohol, oxidative stress, and free radical damage." *Alcohol Res Health* **27** (4): 277-284.
- Würth, K. (2007). *Untersuchung von Alterungsvorgängen phenolischer Inhaltsstoffe im Hinblick auf die Saftqualität und Festlegung des Mindesthaltbarkeitsdatums von roten Traubensäften (Vitis Vinifera) sowie Saft und Konzentrat der schwarzen Johannisbeere (Ribes nigrum L.) und der Aroniabeere (Aronia melanocarpa)*. Dissertation TU Kaiserslautern 2007, Der Andere Verlag, Tönning., Der Andere Verlag.
- Yang, B., J. Koponen, R. Tahvonen und H. Kallio (2003). "Plant sterols in seeds of two species of *Vaccinium* (*V. myrtillus* and *V. vitis-idaea*) naturally distributed in Finland " *Eur Food Res Technol* **216** (1): 34-38.
- Yi, W., J. Fischer, G. Krewer und C. C. Akoh (2005). "Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis." *J Agric Food Chem* **53** (18): 7320-7329.
- Yoshida, M., T. Sakai, N. Hosokawa, N. Marui, K. Matsumoto, A. Fujioka, H. Nishino und A. Aoike (1990). "The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells." *FEBS Lett* **260** (1): 10-13.
- Youdim, K. A., J. McDonald, W. Kalt und J. A. Joseph (2002). "Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults." *J Nutr Biochem* **13** (5): 282-288.

- Yue, X. und Z. Xu (2008). "Changes of anthocyanins, anthocyanidins, and antioxidant activity in bilberry extract during dry heating." *J Food Sci* **73** (6): C494-C499.
- Zadernowski, R., M. Naczek und J. Nesterowicz (2005). "Phenolic acid profiles in some small berries." *J Agric Food Chem* **53** (6): 2118-2124.
- Zeng, X. und E. Ruckenstein (1999). "Membrane chromatography: preparation and applications to protein separation." *Biotechnol Prog* **15** (6): 1003-1019.
- Zhang, H., M. Zhang, L. Yu, Y. Zhao, N. He und X. Yang (2012). "Antitumor activities of quercetin and quercetin-5',8-disulfonate in human colon and breast cancer cell lines." *Food Chem Toxicol* **50** (5): 1589-1599.
- Zhao, C., M. M. Giusti, M. Malik, M. P. Moyer und B. A. Magnuson (2004). "Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth." *J Agric Food Chem* **52** (20): 6122-6128.

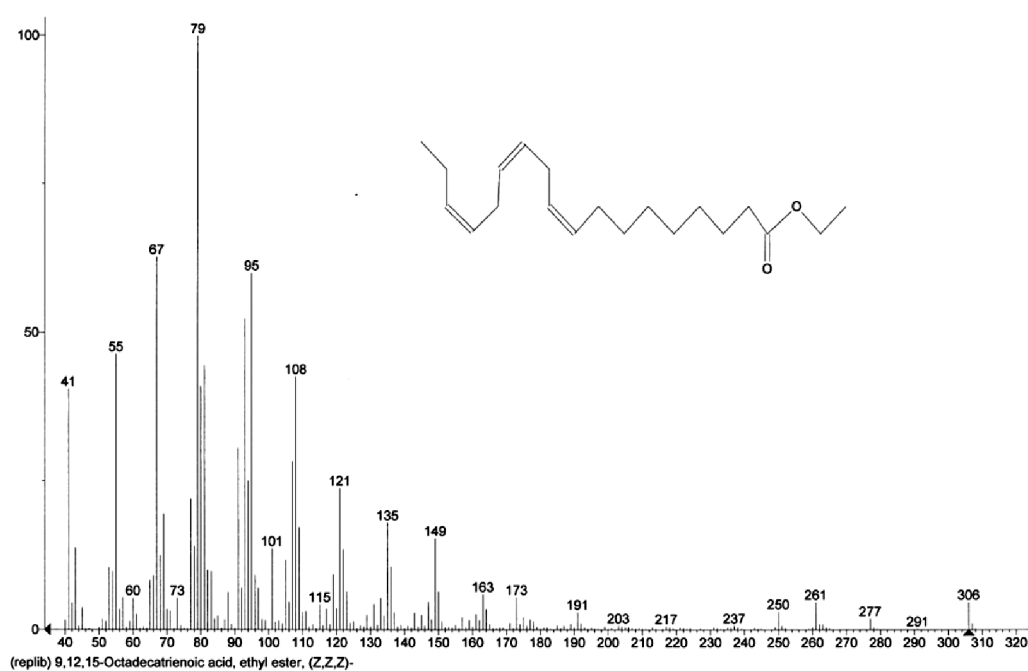
7 Anhang

7.1 EI-MS-Spektren der aus Heidelbeertrester isolierten lipophilen Verbindungen.

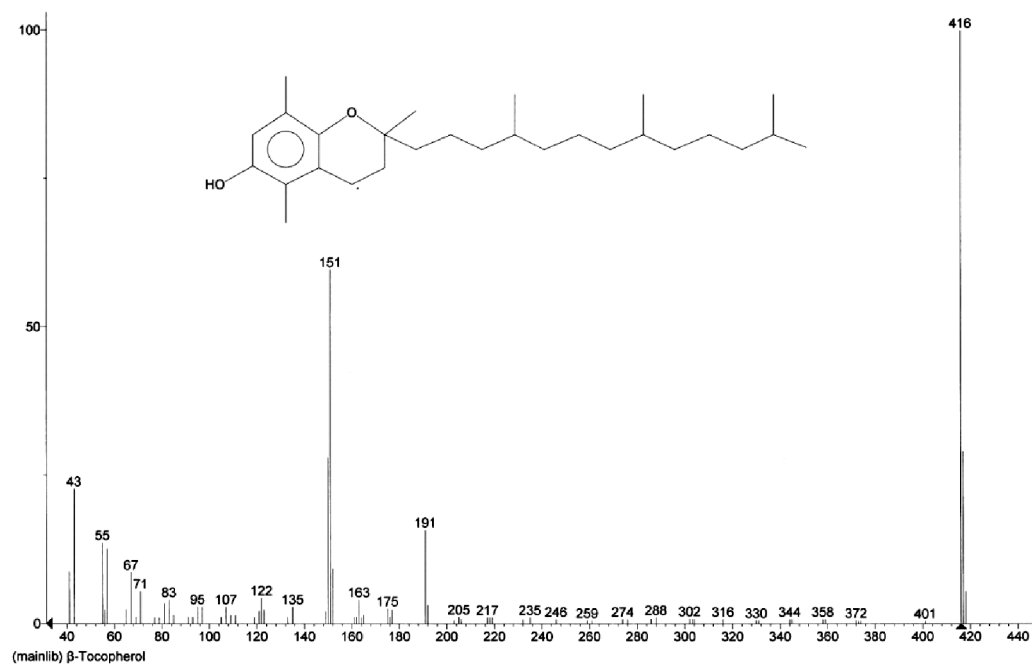
7.1.1 Oleanolsäure (V1)



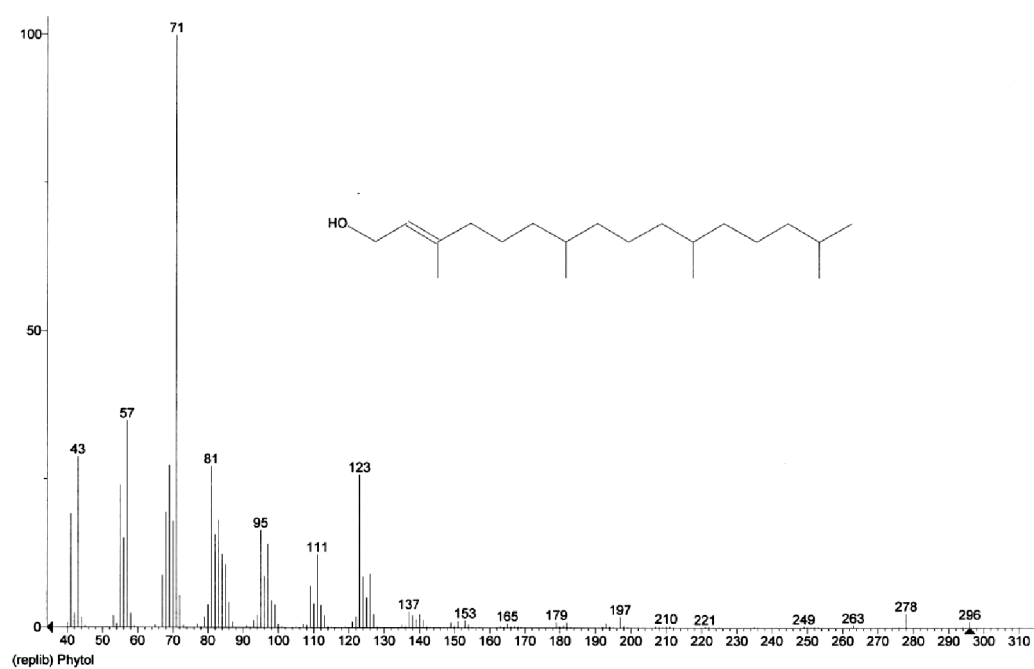
7.1.2 α -Linolensäureethylester (V2)



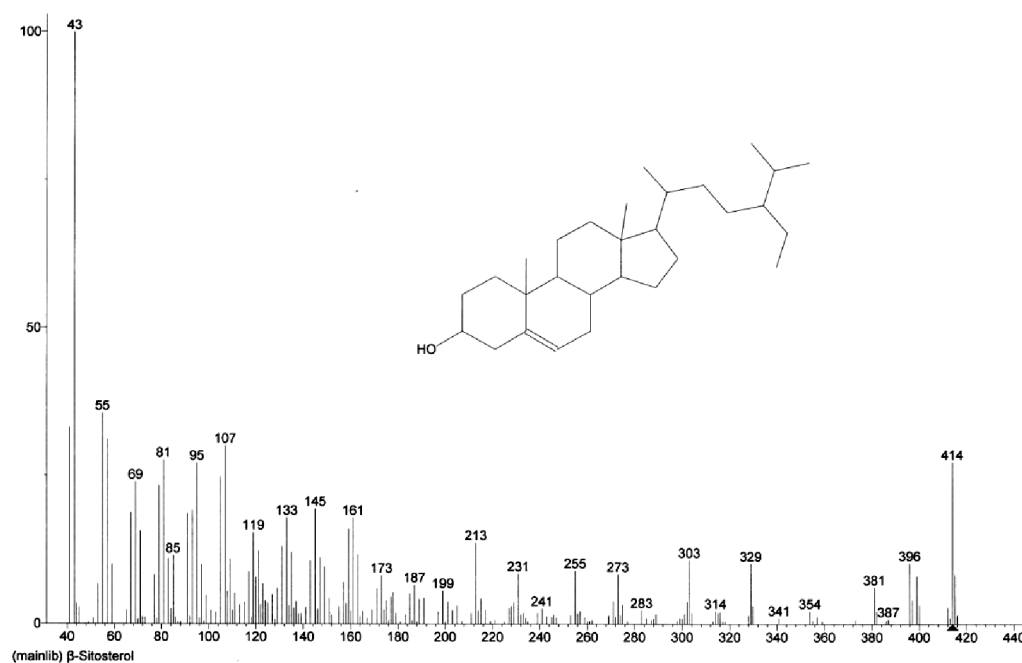
7.1.3 β -Tocopherol (V3)



7.1.4 Phytol (V4)



7.1.5 β -Sitosterol (V5)



7.1.6 β -Amyrin (V6)

